

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 916 998**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2017 PCT/EP2017/050668**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121850**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2017 E 17701078 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2022 EP 3402811**

(54) Título: **Análogos del EGF(A) con sustituyentes de ácidos grasos**

(30) Prioridad:

**13.01.2016 WO PCT/CN2016/070791
17.03.2016 WO PCT/CN2016/076580
27.10.2016 EP 16195965**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2022

(73) Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK**

(72) Inventor/es:

**CHEN, JIANHE;
LAU, JESPER F.;
KODRA, JÁNOS TIBOR;
WIECZOREK, BIRGIT;
LINDEROTH, LARS;
THØGERSEN, HENNING;
RASMUSSEN, SALKA ELBØL y
GARIBAY, PATRICK WILLIAM**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 916 998 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

Análogos del EGF(A) con sustituyentes de ácidos grasos

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a análogos del EGF(A) y derivados de los mismos, más particularmente a análogos peptídicos del EGF(A) con un sustituyente de ácido graso.

10 Antecedentes

Los niveles altos de LDL-C (colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad) y la dislipidemia son promotores bien reconocidos de una enfermedad cardiovascular.

15 Se han aprobado las estatinas para el tratamiento de la dislipidemia durante 25 años. Esta clase ha demostrado una reducción sustancial y consistente de eventos cardiovasculares con un perfil de seguridad aceptable. La estatina más vendida, atorvastatina (LipitorTM) fue el fármaco más vendido del mundo en todo momento, con más de 125 mil millones USD en ventas del 1996 al 2012.

20 A pesar de la disponibilidad y el amplio uso de las estatinas y otros agentes reductores de lípidos, muchos pacientes no logran sus niveles objetivos de LDL-C y mantienen un riesgo alto de desarrollar una enfermedad cardiovascular. La PCSK9 (Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 9) promueve la degradación del LDL-R (receptor de LDL) hepático, lo que reduce de esta manera la expresión superficial del LDL-R hepático y, en consecuencia, la eliminación de las partículas de LDL. Por el contrario, el bloqueo de PCSK9 aumenta la eliminación de LDL-C así como también de otras lipoproteínas aterogénicas. De hecho, los receptores de LDL contribuyen a la eliminación de lipoproteínas aterogénicas diferentes de LDL, tales como lipoproteínas de densidad intermedia y partículas remanentes. El aumento de la eliminación de las lipoproteínas de densidad intermedia y de partículas remanentes puede tener beneficios terapéuticos más allá de los proporcionados por la reducción de LDL.

25 30 Las estatinas aumentan la expresión tanto del LDL-R como de PCSK9 mediante el factor de transcripción SREBP2. El aumento de la expresión de PCSK9 puede disminuir el efecto de las estatinas en la eliminación de LDL-C de la circulación. Al inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R y prevenir de esta manera la degradación del LDL-R se mejora la eficacia de las estatinas. En conjunto, la inhibición de PCSK9 ofrece un enfoque novedoso para el manejo de lípidos.

35 35 Dos anticuerpos anti-PCSK9, alirocumab/Praluent[®] y evolocumab/Repatha[®], se han aprobado recientemente para el tratamiento de los niveles altos de LDL-C. Estos se administran mediante inyecciones subcutáneas de 1 ml cada dos semanas. Sin embargo, podría cuestionarse el cumplimiento de este régimen de dosificación de un fármaco administrado por vía subcutánea, especialmente para una afección asintomática.

40 45 40 La secuencia del EGF(A) (dominio A similar al factor de crecimiento epidérmico) (40 aminoácidos) del LDL-R (LDL-R(293-332)) es bien reconocida como el sitio para la unión a PCSK9. Se ha demostrado que el péptido del EGF(A) natural aislado inhibe la unión de PCSK9 al LDL-R con una IC₅₀ en el intervalo bajo en μ M (Biochemical and Biophysical Research Communications 375 (2008) 69–73). Esta potencia baja impedirá un uso farmacéutico práctico del péptido EGF(A). Además, puede esperarse que la semivida de tales péptidos sea demasiado corta para ser de uso terapéutico.

50 El documento WO2012177741 y J. Mol. Biol. (2012) 422, 685-696 describen análogos del EGF(A) y la fusión a Fc de los mismos.

55 50 Todavía existe la necesidad de mejorar el tratamiento de los pacientes, por ejemplo, en términos de eficacia, también o alternativamente, en términos de conveniencia, comodidad para los pacientes, tal como comodidad y conveniencia del modo de administración y de esta manera su cumplimiento.

Resumen

55 60 La presente invención se refiere a novedosos compuestos del EGF(A) que tienen potencial para mejorar los tratamientos de los pacientes, particularmente en el campo de la disminución del colesterol, la dislipidemia y las enfermedades cardiovasculares.

60 65 La invención en un aspecto se refiere a derivados del EGF(A) que comprenden un análogo peptídico del EGF(A) que comprende 301Leu y un sustituyente que comprende al menos un grupo de ácido graso, en donde el análogo peptídico del EGF(A) tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), aminoácidos 293-332 del LDL-R, definido mediante la SEQ ID NO: 1 y en donde el derivado tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en el ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R descrito en la sección D1.1 en la presente descripción.

La invención proporciona compuestos con mejores propiedades farmacocinéticas (PK). En particular, los compuestos de la invención tienen tiempos de vida media largos y todavía muestran buena capacidad para inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R.

- 5 En una modalidad, la invención proporciona compuestos del EGF (A) con una capacidad mejorada para inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R. En una modalidad, la invención proporciona compuestos con una capacidad de unión mejorada a PCSK9. En una modalidad, la invención proporciona compuestos del EGF (A) con semivida prolongada. En una modalidad la invención proporciona compuestos del EGF(A) con semivida prolongada y sin pérdida o sin pérdida sustancial de la capacidad para inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R. En una modalidad la invención proporciona compuestos del EGF(A) con semivida prolongada y preservación de la capacidad de unión. En una modalidad la invención proporciona compuestos del EGF(A) con una alta estabilidad líquida, adecuados para formulaciones líquidas. En una modalidad la invención proporciona compuestos del EGF(A) con una alta estabilidad *in vivo*. En una modalidad, la invención proporciona compuestos con potencial para la administración oral. En una modalidad, la invención proporciona compuestos del EGF (A) con potencial para un tratamiento más conveniente para el paciente. En una modalidad, la invención proporciona compuestos con potencial para mejorar el cumplimiento del paciente. La invención puede también resolver problemas adicionales que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.
- 10 La invención se refiere a un compuesto que comprende un análogo peptídico del EGF(A) del péptido EGF(A) definido mediante la secuencia SEQ ID NO: 1: Gly-Thr-Asn-Glu-Cys-Leu-Asp-Asn-Asn-Gly-Gly-Cys-Ser-His-Val-Cys-Asn-Asp-Leu-Lys-Ile-Gly-Tyr-Glu-Cys-Leu-Cys-Pro-Asp-Gly-Phe-Gln-Leu-Val-Ala-Gln-Arg-Arg-Cys-Glu, en donde el análogo peptídico comprende 301Leu. La invención se refiere a un derivado del EGF(A) que comprende un análogo peptídico del EGF(A) que comprende 301Leu y al menos un sustituyente que comprende al menos un grupo de ácido graso.
- 15 20 La invención se refiere a un compuesto que comprende un análogo peptídico del EGF(A) del péptido EGF(A) definido mediante la secuencia SEQ ID NO: 1: Gly-Thr-Asn-Glu-Cys-Leu-Asp-Asn-Asn-Gly-Gly-Cys-Ser-His-Val-Cys-Asn-Asp-Leu-Lys-Ile-Gly-Tyr-Glu-Cys-Leu-Cys-Pro-Asp-Gly-Phe-Gln-Leu-Val-Ala-Gln-Arg-Arg-Cys-Glu, en donde el análogo peptídico comprende 301Leu. La invención se refiere a un derivado del EGF(A) que comprende un análogo peptídico del EGF(A) que comprende 301Leu y al menos un sustituyente que comprende al menos un grupo de ácido graso.
- 25 En una modalidad, el derivado del EGF(A), comprende un análogo peptídico del EGF(A) en donde, como se describió más arriba, el aminoácido 301 es Leu (L), a la vez que el péptido comprende además el/los residuo(s) naturales(s) en una o más de las posiciones 295 (Asn/N), 296 (Glu/E), 298 (Leu/L), 302 (Gly/G) y 310 (Asp/D).
- 30 En modalidades adicionales el análogo peptídico del EGF(A) del derivado del EGF(A) tiene 1-15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1.
- 35 En una modalidad adicional el sustituyente del derivado del EGF(A) no se une al análogo peptídico del EGF(A) por medio de un residuo de aminoácido en ninguna de las posiciones 295, 298, 301, 302, 307 ni 310.
- 40 En una modalidad adicional el sustituyente se une al análogo peptídico del EGF(A) por medio de un residuo de aminoácido distinto de las posiciones 295, 298, 301, 302, 307 y 310.
- 45 En un aspecto, la invención se refiere a un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definidos mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu y 310Asp y en donde el péptido no tiene una sustitución de 299Asp por Glu, Val o His y en donde el análogo tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la sección D1.1 en la presente descripción.
- 50 55 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definidos mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu, 310Asp y una sustitución de aminoácidos de 312Lys y en donde el análogo tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la sección D1.1 en la presente descripción.
- 60 En modalidades adicionales los análogos peptídicos del EGF(A) tienen uno, dos, tres, cuatro o cinco de los siguientes residuos de aminoácidos (naturales) 295Asn, 296Glu, 298Leu, 302Gly y 310Asp/D).
- 65 En una modalidad adicional dicho análogo peptídico comprende tres puentes disulfuro en las posiciones 297Cys-308Cys, 304Cys-317Cys y 319Cys-331Cys.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un compuesto de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.
- En otro aspecto, la descripción se refiere al uso médico de los compuestos de acuerdo con la invención.
- Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los niveles de expresión hepática del LDL-R en ratones, medidos por inmunoelectrotransferencia, presentados como diagrama de dispersión para los animales individuales.

La figura 2 muestra el colesterol LDL plasmático en hámsteres tratados con vehículo o con compuestos del EGF(A) prolongadores del ejemplo 2.

5 La figura 3 muestra la expresión hepática del LDL-R en hígados de hámsteres tratados con vehículo o con compuestos del EGF(A) prolongadores del ejemplo 2, medida por inmunoelectrotransferencia.

Breve descripción del listado de secuencias

10 La secuencia de aminoácidos del EGF(A) natural (LDL-R(293-332)) se incluye en el listado de secuencias como la SEQ ID NO: 1. Las SEQ ID NO 2-78 son las secuencias de aminoácidos de los péptidos del EGF(A) de los compuestos del EGF(A) específicos de la invención.

15 Descripción

15 En lo que sigue, las letras griegas pueden representarse por sus símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = epsilon; γ = gamma; δ = delta; ω = omega; etcétera. También, la letra griega de μ puede representarse por "u", por ejemplo, en μl = ul, o en μM = uM.

20 En lo que sigue, "un(un)" significa "uno o más". A menos que se indique de otra forma en la especificación, los términos presentados en forma singular incluyen, también, la situación en plural.

Un asterisco (*) en una fórmula química designa i) un punto de unión, ii) un radical y/o iii) un electrón no compartido.

25 Características estructurales

25 Compuesto del EGF(A)

El término "compuesto del EGF(A)" se usa en la presente descripción para referirse generalmente a un compuesto que comprende un péptido del EGF(A), que abarca el LDL-R(293-332) en peso como se define mediante la SEQ ID NO: 1 y análogos de los mismos. El término compuesto del EGF(A) abarca derivados del péptido del EGF(A) y análogos de los mismos, es decir, los análogos peptídicos del EGF(A) con un sustituyente como se describió en la presente descripción, es un típico ejemplo de un compuesto del EGF(A).

35 Péptidos del EGF(A)

35 El término "péptido", como se usa, por ejemplo, en el contexto de la invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados mediante enlaces amida (o peptídicos). En una modalidad particular el péptido consiste en aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

40 El péptido de la invención comprende al menos 35, tal como 36, 37, 38, 39 o al menos 40 aminoácidos. En una modalidad particular el péptido está compuesto por 36, tal como 38 o 40 aminoácidos. En una modalidad particular adicional, el péptido consiste en 35, 36, 37, 38, 39 o 40 aminoácidos.

45 En presencia de adiciones de aminoácidos, denominadas en la presente descripción como alargamientos N-terminal y C-terminal, el péptido de la invención puede comprender hasta 140 aminoácidos. En una modalidad, el péptido de la invención puede comprender o consistir en residuos de 41 aminoácidos. En una modalidad particular, este comprende 40-140, 40-120, 40-100, 40-80, 40-60 o 40-50 aminoácidos.

50 Las expresiones "dominio EGF(A) del LDL-R", "LDL-R (293-332)", "LDL-R nativo (293-332)", "EGF(A) (293-332)", "EGF(A) natural", "EGF(A) en peso" o "EGF(A) nativo" como se usan en la presente, se refieren a un péptido que consiste de la secuencia SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 1 es :

55 Gly-Thr-Asn-Glu-Cys-Leu-Asp-Asn-Asn-Gly-Gly-Cys-Ser-His-Val-Cys-Asn-Asp-Leu-Lys-Ile-Gly-Tyr-Glu-Cys-Leu-Cys-Pro-Asp-Gly-Phe-Gln-Leu-Val-Ala-Gln-Arg-Arg-Cys-Glu.

60 En esta fórmula la numeración de los residuos de aminoácidos sigue la numeración para el dominio EGF(A) del LDL-R (LDL-R-(293-332)), en donde el primer residuo de aminoácido (N-terminal) se numera o se concede la posición núm. 293, y los residuos de aminoácidos subsecuentes hacia el extremo C se numeran 294, 295, 296 y así sucesivamente, hasta el último residuo de aminoácido (C-terminal), que en el dominio EGF(A) del LDL-R es Glu con el número 332.

65 La numeración se realiza de manera diferente en el listado de secuencias, donde el primer residuo de aminoácido de SEQ ID NO: 1 (Gly) se asigna núm. 1 y el último (Glu) núm. 40. Lo mismo se aplica para las otras secuencias del listado de secuencias, es decir, el aminoácido N-terminal asignado es el núm. 1 independientemente de su posición

con relación a 293Gly o el residuo de aminoácido que sustituye el 293 con referencia a LDL-R(293-332). Sin embargo, en la presente descripción la numeración de las posiciones de aminoácidos es con referencia a LDL-R(293-332), como se explicó más arriba.

5 Se describen en la presente descripción los análogos peptídicos del EGF(A) identificados mediante la SEQ ID NO: 1 y los derivados de tales análogos peptídicos del EGF(A) del dominio EGF(A) natural del LDLR definido mediante la SEQ ID NO: 1.

10 El término "análogo" generalmente se refiere a un péptido, cuya secuencia tiene uno o más cambios de aminoácidos cuando se compara con una secuencia de aminoácidos de referencia.

15 Los términos "análogo de la invención", "análogo peptídico de la invención", "análogo del LDL-R(293-332)", "análogo del EGF(A)" o "análogo de SEQ ID NO: 1" como se usan en la presente pueden referirse como un péptido, cuya secuencia comprende sustituciones de aminoácidos, es decir, reemplazos de aminoácidos con relación a la secuencia SEQ ID NO: 1. Un "análogo" también puede incluir alargamientos de aminoácidos en las posiciones N-terminal y/o C-terminal y/o truncamientos en las posiciones N-terminal y/o C-terminal.

20 El nivel de identidad con la SEQ ID NO: 1 puede calcularse mediante la determinación del número de aminoácidos que no se cambian con relación a la SEQ ID NO 1. La SEQ ID NO: 1 consiste en 40 residuos de aminoácidos y si se introducen tres sustituciones de aminoácidos el nivel de identidad es 37/40 % = 92,5 %. Si se cambian 5 residuos de aminoácidos el nivel de identidad es 87,5 %. Si el péptido se alarga en dirección N-terminal o C-terminal esa parte usualmente no se incluye en la comparación, mientras que una delección de uno o más aminoácidos acorta el comparador. Por ejemplo, en los ejemplos mencionados más arriba, si el aminoácido N-terminal se elimina el nivel de identidad se reduce ligeramente a 36/39X100 % y 34/39X100 %, respectivamente. Al analizar la identidad de la secuencia de la cadena principal de un derivado del residuo de aminoácido del sustituyente, por ejemplo, el residuo al cual se une el sustituyente, también denominado el residuo de aminoácido del sustituyente, puede ser un aminoácido ya sea natural (wt) o sustituido. Si el residuo de aminoácido del sustituyente es un residuo de natural, tal como la Gly N-terminal o 312K este residuo se incluye en el cálculo del nivel de identidad, mientras que una Lys en cualquier otra posición de 293 a 332 sería una sustitución de aminoácidos y no se incluye cuando se calcula la identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO:1.

30 En una modalidad, el análogo peptídico del EGF(A) tiene de 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1, tal como 1-7, 1-6, 1-5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1. En una modalidad particular, pueden estar presentes hasta 7 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo hasta 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos en el análogo peptídico del EGF-1.

35 En una modalidad el análogo de la invención tiene al menos un 75 % de identidad, tal como 80 %, tal como 85, tal como 90 o incluso 95 % de identidad con la SEQ ID NO:1 lo que se corresponde con hasta 10, 8, 6, 4 y 2 sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO 1, respectivamente en caso de no truncamiento.

40 40 Cada uno de los análogos peptídicos de la invención pueden describirse como referencia i) al número del residuo de aminoácido en EGF(A) nativo (LDL-R(293-332)) que corresponde al residuo de aminoácido que se cambia (es decir, la posición correspondiente en el EGF(A) LDL-R(293-332)) nativo, y ii) al cambio real.

45 45 En otras palabras, los análogos peptídicos de la invención pueden describirse como referencia al péptido del EGF(A) LDL-R(293-332) nativo, específicamente como una variante del mismo, en el cual se ha cambiado una cantidad de residuos de aminoácidos cuando se compara con el EGF(A) LDL-R(293-332) nativo (SEQ ID NO: 1). Estos cambios pueden representar, independientemente, una o más sustituciones de aminoácidos.

50 50 Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura adecuada de los análogos:
El péptido del EGF(A) incorporado en el derivado del Ejemplo 2 en la presente descripción puede referirse como el siguiente análogo del EGF(A) del LDL-R(293-332): (301Leu, 309Arg) LDL-R(293-332) EGF(A), o (Leu301, Arg309)-LDL-R(293-332) EGF(A) o (301L,309R) LDL-R(293-332) o (L301,R309) LDL-R(293-332). Esto significa que cuando este análogo se alinea con el LDL-R(293-332) nativo, tiene i) una Leu en la posición en el análogo que corresponde, de acuerdo con la alineación, a la posición 301 en el EGF(A) LDL-R(293-332) nativo, ii) una Arg en la posición en el análogo que corresponde a la posición 309 en el EGF(A) LDL-R(293-332) nativo.

60 Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, cuando se comparan con la SEQ ID NO: 1.

65 65 En una modalidad particular, el análogo "tiene" o "comprende" los cambios especificados. En una modalidad particular, el análogo "consiste en" los cambios. Cuando el término "consiste" o "que consiste" se usa en relación con un análogo, por ejemplo, un análogo consiste o que consiste de un grupo de sustituciones de aminoácidos especificadas, debe entenderse que las sustituciones de aminoácidos especificadas son las únicas sustituciones de aminoácidos en el análogo peptídico. Por el contrario un análogo "que comprende" un grupo de sustituciones de aminoácidos especificadas puede tener sustituciones adicionales.

Como es evidente a partir de los ejemplos mencionados más arriba, los residuos de aminoácidos pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son completamente equivalentes.

- 5 Las expresiones "un posición equivalente a" o "posición correspondiente" pueden usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia del EGF(A) LDL-R(293-332) en referencia a la secuencia de referencia nativa del EGF(A) LDL-R(293-332) (SEQ ID NO: 1). Las posiciones equivalentes o correspondientes, así como también la cantidad de cambios, se deducen fácilmente, por ejemplo mediante simple escritura e inspección visual; y/o puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "align" que se basa en un algoritmo de Needleman-Wunsch.

En lo que sigue, puede ocurrir que se defina una fórmula química de manera que dos grupos químicos subsecuentes puedan seleccionarse para ser "un enlace". En tales casos, los dos grupos químicos subsecuentes realmente estarían ausentes, y solo un enlace conectaría los grupos químicos circundantes.

- 15 10 Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, frecuentemente denominados cadena lateral.

- 20 20 El término "aminoácido" incluye aminoácidos proteinogénicos (o naturales) (entre ellos los 20 aminoácidos estándar), así como también aminoácidos no proteinogénicos (o no naturales). Los aminoácidos proteinogénicos son aquellos que se incorporan naturalmente en las proteínas. Los aminoácidos estándar son los codificados por el código genético. Los aminoácidos no proteinogénicos o no se encuentran en proteínas, o no se producen por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haberse sometido a modificación postraduccional). Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinogénicos son Aib (ácido α -aminoisobutírico, o ácido 2-aminoisobutírico), norleucina, norvalina, así como también los isómeros D de los aminoácidos proteinogénicos.

25 En lo que sigue, cada aminoácido de los péptidos de la invención para los cuales no se indica el isómero óptico debe entenderse que se refiere al isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

30 30 Análogos peptídicos

- 35 Los análogos peptídicos se definen como péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es un análogo de SEQ ID NO: 1. Los análogos peptídicos tienen la capacidad de unirse a la PCSK9 y tienen una capacidad mejorada de unirse a la PCSK9, por ejemplo en comparación con el LDL-R(293-332) nativo (EGF-(A) nativo) o con otros compuestos de unión a la PCSK9. Los análogos peptídicos tienen además la capacidad de inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R. Los análogos peptídicos inhiben la unión de PCSK9 al Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) humano y dicha unión puede evaluarse mediante el uso del ensayo descrito en el Ejemplo D.1.1 en la presente descripción.

- 40 40 Un aspecto de la invención se refiere a un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definido mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu y 310Asp y en donde el péptido no tiene una sustitución de 299Asp por Glu, Val o His y en donde el análogo tiene una K_i por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R como se describió en la sección D1.1 en la presente descripción.

- 45 50 Un aspecto de la invención se refiere a un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definidos mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu, 310Asp y una sustitución de aminoácidos de 312Lys y en donde el análogo tiene una K_i por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la sección D1.1 en la presente descripción.

- 55 En una modalidad los análogos peptídicos y los derivados peptídicos de la invención son péptidos inhibidores de PCSK9 o simplemente inhibidores de PCSK9. En una modalidad la invención se refiere a un análogo peptídico de SEQ ID NO:1, en donde el análogo peptídico es capaz de inhibir la unión de PCSK9 al receptor humano de la lipoproteína de baja densidad (LDL-R).

- 60 En una modalidad los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 de la invención tienen una capacidad mejorada de unirse a PCSK9 en comparación con EGF(A), LDL-R(293-332) (SEQ ID 1).

- 65 60 En una modalidad, los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 de la invención tienen una capacidad mejorada para unirse a PCSK9 en comparación con el Ej. 48 (SEQ ID 2).

- 65 En una modalidad, la K_i de los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 como se describió en la presente descripción, cuando se mide en el ensayo de ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, está por debajo de 10 nM, tal como por debajo de 8 nM o tal como por debajo de 5 nM.

- La funcionalidad de los análogos del EGF-(A) y los derivados de los mismos puede caracterizarse adicionalmente por sus capacidades para mejorar la captación de LDL, como se describió en el Ejemplo D1.2 en la presente descripción. En una modalidad, los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 de la invención aumentan la captación de LDL en presencia de PCSK9. En una modalidad, los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 de la invención son capaces de revertir o reducir la reducción de la captación de LDL mediada por PCSK9.
- En una modalidad, los análogos peptídicos, compuestos o inhibidores de PCSK9 de la invención tienen una EC50 según se mide en el ensayo de captación de LDL, por debajo de 1500 nM, tal como por debajo de 1000 nM o tal como por debajo de 500 nM.
- En una modalidad, un análogo peptídico de la invención puede definirse como que comprende al menos 1 sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 1, y opcionalmente un alargamiento. En una modalidad, un análogo peptídico de la invención puede definirse como que comprende hasta 15, hasta 14, hasta 13, hasta 12, hasta 11, hasta 10, hasta 9, hasta 8, hasta 7, hasta 6, hasta 5, hasta 4, hasta 3, hasta 2 o 1 sustitución(ciones) de aminoácido(s) en comparación con la SEQ ID NO: 1, y opcionalmente un alargamiento. Esto significa que un péptido que comprende un alargamiento en el N-terminal y/o en el C-terminal puede comprender hasta 15 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 293 a 332 además de dicho alargamiento.
- Un “alargamiento” de aminoácidos también puede denominarse “extensión”. En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención comprenden un alargamiento. Dicho alargamiento puede ser una adición de hasta 50 residuos de aminoácidos en la posición N-terminal de la SEQ ID NO: 1 o un análogo de la misma, denominado también como un alargamiento N-terminal, lo que significa que un péptido de la invención puede comprender hasta 50 aminoácidos desde la posición 292 hacia abajo, por ejemplo, la posición 242. Adicionalmente o alternativamente, dicho alargamiento puede ser una adición de hasta 50 residuos de aminoácidos en la posición C-terminal de la SEQ ID NO: 1 o un análogo de la misma, denominado también como un alargamiento C-terminal, lo que significa que un péptido de la invención puede comprender hasta 50 aminoácidos desde la posición 333 hacia arriba, por ejemplo, la posición 383.
- Dicho alargamiento puede estar presente ya sea en el N-terminal, en el C-terminal o ambos. Dicho alargamiento puede ser también de cualquier longitud entre 0 y 50 aminoácidos en cada lado, independientemente entre sí. En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención comprenden un alargamiento N-terminal de 1-50, 1-40, 10-40, 1-30, 10-30, 20-30, 20-40, 20-50, 30-50, 1-10, 11-20, 21-30, 31-40 o 41-50 de residuos de aminoácidos o de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 residuos de aminoácidos. Además o alternativamente, los análogos peptídicos de la invención pueden comprender un alargamiento del C-terminal de 1-50, 1-40, 10-40, 1-30, 10-30, 20-30, 20-40, 20-50, 30-50, 1-10, 11-20, 21-30, 31-40 o 41-50 residuos de aminoácidos o de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 residuos de aminoácidos.
- Un alargamiento puede referirse, en alguna situación, a una sustitución a medida que se introduce un nuevo residuo de aminoácido, tal como el 292A, 292Lys o 333Lys ejemplificado en la presente descripción.
- Los truncamientos menores en el N-terminal y/o C-terminal del péptido del EGF(A) pueden estar presentes en el análogo peptídico del EGF(A).
- En una modalidad el péptido del EGF(A) comprende al menos 35 residuos de aminoácidos, tal como 36 residuos de aminoácidos, tal como 37 residuos de aminoácidos, tal como 38 residuos de aminoácidos o tal como 39 residuos de aminoácidos. En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con, comprende un truncamiento N-terminal de 1-2 residuos de aminoácidos. En una modalidad se eliminan uno o dos residuos de aminoácidos en el N-terminal. En modalidades adicionales el análogo peptídico del EGF(A) comprende en consecuencia un truncamiento N-terminal que elimina al menos o específicamente el aminoácido 293Gly.
- En modalidades adicionales el análogo peptídico del EGF(A) comprende un truncamiento N-terminal que elimina al menos o específicamente 293Gly-294Thr.
- En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) comprende un truncamiento C-terminal de 1 residuo de aminoácido. En una modalidad se elimina un único residuo de aminoácido C-terminal. En una modalidad el análogo peptídico comprende un truncamiento C-terminal que elimina específicamente el aminoácido 332Glu.
- Además o alternativamente, un análogo peptídico de la invención puede comprender al menos un alargamiento de aminoácidos en el N-terminal o el C-terminal por ejemplo en la posición 292 y/o 333.
- El análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende la sustitución de aminoácidos del residuo de aminoácido 301 de Asn por Leu, descrita también como Asn301Leu, o simplemente 301Leu. En una modalidad específica, el análogo peptídico del EGF(A) comprende la sustitución 301Leu.

Además, o alternativamente el análogo peptídico del EGF(A) comprende los residuos de aminoácidos 297Cys, 304Cys, 308Cys, 317Cys, 319Cys y 331Cys. Esos residuos de Cys son residuos naturales que pueden estar acoplados en puentes disulfuro, tales como los puentes disulfuro entre 297Cys y 308Cys, entre 304Cys y 317Cys y entre 319Cys y 331Cys.

- 5 En una modalidad, el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu y una cantidad de sustituciones de aminoácidos adicionales, como se describió anteriormente.
- 10 En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu, 310Asp y una sustitución de aminoácidos de 312Lys.
- 15 En una modalidad, el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu y 310Asp y en donde el análogo peptídico no tiene una sustitución de 299Asp por Glu, Val o His.
- 20 En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu, 309Arg y 312Glu.
- 25 En una modalidad adicional el análogo peptídico no tiene ninguna de las sustituciones D310K, D310N, D310Q, D310Q, D310R y D310A o incluso cualquier sustitución de 310Asp.
- 30 En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) comprende uno, dos, tres o los cuatro residuos naturales: 295Asn, 296Glu, 298Leu y 302Gly.
- 35 En una modalidad el análogo peptídico del EGF(A) comprende uno, dos, tres, cuatro o los cinco residuos naturales: 295Asn, 296Glu, 298Leu, 302Gly y 310Asp.
- 40 En una modalidad el péptido tiene 295Asn.
- 45 En una modalidad el análogo peptídico tiene 296Glu. En una modalidad el análogo peptídico tiene 298Leu. En una modalidad el análogo peptídico tiene 302Gly. En una modalidad el análogo peptídico tiene 310Asp.
- 50 En una modalidad el análogo peptídico tiene dos o más de 310Asp, 295Asn y 296Glu. En una modalidad el análogo peptídico tiene los tres de 310Asp, 295Asn y 296Glu.
- 55 El análogo peptídico del EGF(A) puede comprender sustituciones de aminoácidos adicionales como se describió en la presente descripción. En una modalidad el análogo de la invención puede comprender además una o más sustituciones de aminoácidos en una(s) posición(ciones) seleccionada(s) del grupo de posiciones: 293, 294, 296, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 329, 330 y 332.
- 60 En una modalidad el análogo de la invención puede comprender además una o más sustituciones de aminoácidos en una(s) posición(ciones) seleccionada(s) del grupo de posiciones: 293, 294, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 329, 330, 331 y 332.
- 65 En una modalidad el análogo de la invención puede comprender además una o más sustituciones de aminoácidos en una(s) posición(ciones) seleccionada(s) del grupo de posiciones: 293, 294, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 329, 330, 331 y 332.
- 70 En una modalidad el análogo de la invención puede comprender además una o más sustituciones de aminoácidos adicionales en una(s) posición(ciones) seleccionada(s) del grupo de posiciones: 293, 294, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 329, 330, 331 y 332.
- 75 En una modalidad el análogo de la invención puede comprender además una o más sustituciones de aminoácidos adicionales en una(s) posición(ciones) seleccionada(s) del grupo de posiciones: 293, 294, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 328, 329, 330, 331 y 332.
- 80 En una modalidad el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Gly(G) o Asn(N) en la posición 293.

En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Trp (W), Thr(T) o Gly(G) en la posición 294.

5 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asp(D), Gly(G), Pro(P), Arg(R), Lys(K), Ser(S), Thr(T), Asn(N), Gln(Q), Ala(A), Ile(I), Leu(L), Met(M), Phe(F), Tyr(Y) o Trp(W) en la posición 299.

10 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asp(D), Gly(G), Pro (P), Arg(R), Lys(K), Ser(S), Thr(T), Asn(N), Gln(Q), Ala(A), Met(M), Phe(F), Tyr(Y) o Trp(W) en la posición 299.

15 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asp(D), Ser (S), Arg(R), Leu (L), Ala (A), Lys(K) o Tyr(Y) en la posición 299.

En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asp(D) o Ala(A) en la posición 299.

20 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Val(V), Ser(S), Thr (T) o Ile (I) en la posición 307.

25 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Val(V), o Ile (I) en la posición 307.

25 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende Ser(S), Thr (T) o Ile (I) en la posición 307.

En una modalidad tal el análogo de la invención comprende Ile (I) en la posición 307.

30 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asn(N), Glu (E), His (H), Arg (R), Ser (S) o Lys (K) en la posición 309.

35 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asn(N), Arg (R), Ser (S) o Lys (K) en la posición 309.

En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asn(N), Arg (R), o Ser (S) en la posición 309.

40 En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Asn(N) o Arg (R) en la posición 309.

En una modalidad tal el análogo de la invención comprende el residuo de aminoácido Lys(K) o Arg (R) en la posición 309.

45 El análogo peptídico del EGF(A) puede comprender varias sustituciones de aminoácidos como se describió en la presente descripción, tal como una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo de: 299Ala, 307Ile y 321Glu.

50 En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo de aminoácido Asp(D), Lys (K) o Glu(E) en la posición 321.

En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo de aminoácido Asp(D) o Glu(E) en la posición 321.

55 En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo de aminoácido Glu(E) en la posición 321.

En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo de aminoácido Gln (Q) o Gly (G) en la posición 324.

60 En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo de aminoácido Arg (R) o His (H) en la posición 329.

En modalidades adicionales, el análogo peptídico del EGF(A) no tiene una sustitución de 300Asn(N) por Pro(P).

El dominio EGF(A) del LDL-R incluye una Lisina en la posición 312 que puede usarse para la sustitución como se describió en la presente descripción. En modalidades donde la unión del sustituyente a 312 no se desea 312Lys puede sustituirse por otro aminoácido como se describió en la presente descripción.

- 5 En una modalidad, la Lys en la posición 312 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de: Gly, Pro, Asp, Glu, Arg, His, Ser, Thr, Asn, Gln, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe y Tyr. En una modalidad, la Lys en la posición 312 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de: Gly, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Ala, Val, Ile, Leu, Phe y Tyr. En una modalidad, la Lys en la posición 312 se sustituye por un residuo de aminoácido seleccionado de: Asp, Glu, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe y Tyr. En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Asp, 312Glu, 312Thr, 312Asn, 312Ile o 312Phe. En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Glu, 312Asp, 312Gln o 312Arg.

En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Glu, 312Thr, 312Asn, 312Ile, 312Phe o 312Tyr. En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Glu, 312Asn o 312Ile,

- 10 15 En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Glu o 312Arg. En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Arg. En una modalidad, 312Lys se sustituye por 312Glu.

Para incluir una opción para unir el sustituyente en diversas posiciones (ver en detalle más abajo), una Lys puede introducirse por la sustitución de aminoácidos de un residuo natural de SEQ ID NO: 1 o por un alargamiento peptídica de SEQ ID NO: 1, tal como una 292Lys o una 333Lys.

20 En los casos donde se desea más de un sustituyente, uno puede ser por medio de 312Lys mientras que el segundo es por medio de una Lys introducida por alargamiento o sustitución peptídica en la SEQ ID NO: 1.

- 25 En una modalidad el análogo peptídico de SEQ ID NO: 1 comprende al menos un residuo de Lys en una posición seleccionada del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 296Lys, 299Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 30 En una modalidad el análogo peptídico de SEQ ID NO: 1 comprende al menos un residuo de Lys en una posición seleccionada del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 35 En una modalidad el análogo peptídico de SEQ ID NO: 1 comprende al menos un residuo de Lys en una posición seleccionada del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 40 En una modalidad el análogo peptídico de SEQ ID NO: 1 comprende al menos un residuo de Lys en una posición seleccionada del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 45 En una modalidad el análogo peptídico de SEQ ID NO: 1 comprende al menos un residuo de Lys en una posición seleccionada del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 50 Además o alternativamente, el análogo peptídico de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 298Lys, 299Lys, 301Lys, 302Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 307Lys, 309Lys, 310Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 55 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 298Lys, 299Lys, 302Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 307Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 60 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 298Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 65 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 65 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

5 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 296Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

10 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

15 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

20 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 310Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

25 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 310Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

30 En una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada de 292Lys, 293Lys, 294Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 310Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys. En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención no comprenden ninguna de las siguientes sustituciones: 296K, 298K, 301K, 302K y 307K.

35 En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención no comprenden ninguna de las siguientes sustituciones: 296K, 298K, 301K, 302K, 307K y 310K.

En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención no comprenden ninguna de las siguientes sustituciones: 296K, 298K, 301K, 302K, 307, y 295K.

40 En una modalidad, los análogos peptídicos de la invención no comprenden ninguna de las siguientes sustituciones: 296K, 298K, 301K, 302K, 307K y 295D.

45 En una modalidad particular, el análogo peptídico de la invención comprende 1 o 2, de tales sustituciones de Lys. Además o alternativamente, el péptido de la invención puede comprender 312Lys.

En una modalidad el análogo peptídico de la invención comprende dos residuos de Lys. En una modalidad el análogo peptídico de la invención comprende dos residuos de Lys seleccionados de los pares que consisten en:

50	i.	293K y 294K	xiv.	313K y 321K
	ii.	293K y 312K	xv.	313K y 324K
	iii.	293K y 333K	xvi.	313K y 328K
	iv.	309K y 313K	xvii.	313K y 332K
	v.	309K y 324K	xviii.	313K y 333K
55	vi.	309K y 328K	xix.	314K y 333K
	vii.	309K y 332K	xx.	321K y 332K
	viii.	309K y 333K	xxi.	321K y 333K
	ix.	311K y 313K	xxii.	324K y 333K
60	x.	312K y 333K	xxiii.	324K y 328K
	xi.	312K y 313K	xxiv.	328K y 333K
	xii.	312K y 314K	xxv.	330K y 333K y
	xiii.	313K y 314K	xxvi.	332K y 333K.

Como se observa más arriba, en la presente descripción, se proporcionan diversos análogos peptídicos por la presente invención. En una modalidad adicional el análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con la invención

comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos i-xxiv mostrados más abajo en comparación con la SEQ ID NO:1.

5 Todavía en una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención consiste en las sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos i-xxiv como se muestra más abajo.

10 En una modalidad adicional el análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con la invención comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos i-xvi mostrados más abajo en comparación con la SEQ ID NO.:1.

10 Todavía en una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención consiste en las sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos i-xvi como se muestra más abajo.

- i. 301Leu y 309Arg
- ii. 301Leu, 309Arg, 312Glu
- iii. 301Leu, 307Ile y 309Arg
- iv. 301Leu, 307Ile, 309Arg y 312Glu
- v. 301Leu, 309Arg y 321Glu
- vi. 301Leu, 309Arg, 321Glu y 312Glu
- vii. 301Leu, 307Ile, 309Arg y 299Ala
- viii. 301Leu, 307Ile, 309Arg, 299Ala y 312Glu
- ix. 301Leu y 309Arg y al menos una sustitución de Lys
- x. 301Leu, 309Arg, 312Glu y al menos una sustitución de Lys
- xi. 301Leu, 307Ile y 309Arg y al menos una sustitución de Lys
- xii. 301Leu, 307Ile, 309Arg y 312Glu y al menos una sustitución de Lys
- xiii. 301Leu, 309Arg y 321Glu y al menos una sustitución de Lys
- xiv. 301Leu, 309Arg, 321Glu y 312Glu y al menos una sustitución de Lys
- xv. 301Leu, 307Ile, 309Arg y 299Ala y al menos una sustitución de Lys o
- xvi. 301Leu, 307Ile, 309Arg, 299Ala y 312Glu y al menos una sustitución de Lys.

30 En una modalidad adicional el análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con la invención comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos xvii-xx mostrados más abajo en comparación con la SEQ ID NO: 1.

35 Todavía en una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención consiste en las sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos xvii-xx como se muestra más abajo.

- xvii. 301Leu y 309Lys
- xviii. 301Leu, 309Lys y 312Glu
- 40 xix. 301Leu y 309Lys y al menos una sustitución de Lys adicional
- xx. 301Leu, 309Lys y 312Glu y al menos una sustitución de Lys adicional.

45 En una modalidad adicional el análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con la invención comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos xxi-xxiv mostrados más abajo en comparación con la SEQ ID NO: 1.

Todavía en una modalidad adicional, el análogo peptídico del EGF(A) de la invención consiste en la sustitución de aminoácidos identificada mediante cualquiera de los grupos xxi-xxiv como se muestra más abajo

- 50 xxii. 301Leu y 307Ile,
- xxii. 301Leu, 307Ile y 312Glu
- xxiii. 301Leu y 307Ile y al menos una sustitución de Lys adicional y
- xxiv. 301Leu, 3307Ile y 312Glu y al menos una sustitución de Lys adicional.

55 En modalidades específicas adicionales el análogo peptídico o el análogo peptídico de los compuestos de acuerdo con la invención comprenden o consisten en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID 1 a 106.

60 En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID NO: 2-106.

En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID NO: 2-47 and 49-106.

65 En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2-44, 46, 47 y 49-106.

En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID NO: 2-44, 46, 47, 49-53, 55, 58-106.

5 En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID NO: 2-4, 6-44, 46, 47, 49-53, 55, 58-106.

En una modalidad el análogo peptídico comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante las SEQ ID NO: 2-4, 6-19, 21-44, 46, 47, 49-53, 55, 58-106.

10 Compuestos intermedios

La presente invención también se refiere a análogos peptídicos que pueden incorporarse en los derivados de la invención. Tales análogos peptídicos pueden denominarse "producto intermedio" o "compuesto intermedio". Están en forma de análogos del LDL-R(293-332) novedosos, que como se describió anteriormente pueden incorporarse en los derivados del EGF(A) de la invención como se describe en más detalle más abajo. Tales análogos peptídicos son como se definió en la sección mencionada más arriba.

Particularmente, un análogo peptídico, o péptido intermedio, de acuerdo con la presente invención puede denominarse un análogo peptídico de la secuencia SEQ ID NO: 1.

20 En un aspecto la invención se refiere a un análogo peptídico del EGF(A) como se describió en la presente descripción para su uso en la fabricación de un compuesto del EGF(A), tal como un derivado del EGF(A).

25 Otras características, definiciones, aspectos y modalidades descritas en la presente descripción en relación con los análogos peptídicos de la invención pueden aplicarse también a los productos intermedios de la invención.

Derivados del EGF(A)

30 Los análogos peptídicos pueden comprender además un sustituyente y de esta manera se convierten en compuestos derivados.

35 El término "derivado" generalmente se refiere a un compuesto que puede prepararse a partir de un péptido nativo o un análogo del mismo mediante modificación química, en particular mediante unión covalente de uno o dos sustituyentes.

40 45 Las expresiones "derivado de la invención", "derivado del EGF(A)", "derivado del EGF(A) o "derivado del LDL-R(293-332)" o "derivado de un análogo del LDL-R(293-332)" como se usa en la presente se refieren a un péptido al cual se unen uno o dos sustituyentes. Cada uno de estos puede denominarse, también o alternativamente, una cadena lateral. En otras palabras, un "derivado de la invención" comprende un péptido, es decir, una secuencia peptídica, que en la presente descripción es un análogo peptídico del EGF(A), y al menos uno, que incluye tal como uno o dos, sustituyente(s).

50 El término "sustituyente" se usa para describir un resto unido covalentemente al péptido del EGF(A), por ejemplo, el sustituyente es un resto que no es parte del péptido del EGF(A) en sí.

55 En una modalidad el uno o más sustituyente(s) está(n) unido(s) a un átomo de nitrógeno del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad el uno o más sustituyente(s) está(n) unido(s) a un grupo amino del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad el uno o más sustituyente(s) está(n) unido(s) al aminoácido N-terminal del análogo peptídico del EGF(A) o a un residuo de Lys del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad el uno o más sustituyente(s) está(n) unido(s) al aminoácido N-terminal del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad, el uno o más sustituyente(s) se une(n) al nitrógeno alfa del residuo de aminoácido N-terminal del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad, el uno o más sustituyente(s) se une(n) a un residuo de Lys en el análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad el uno o más sustituyente(s) está(n) unido(s) al nitrógeno-épsilon de un residuo de Lys en el análogo peptídico del EGF(A).

60 65 Los ejemplos de sustituyentes son diversos y se describen en más detalle más abajo.

Un aspecto de la invención se refiere a los derivados del EGF(A) que comprenden un análogo peptídico del EGF(A) que comprende 301Leu y un sustituyente que comprende al menos un grupo de ácido graso, en donde el análogo peptídico del EGF(A) tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), aminoácidos 293-332 del LDL-R, definido mediante la SEQ ID NO: 1, y en donde el derivado tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en el ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R descrito en la sección D1.1 en la presente descripción.

65 70 Para todas las modalidades el término derivado del EGF(A) abarca, también, cualquier sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

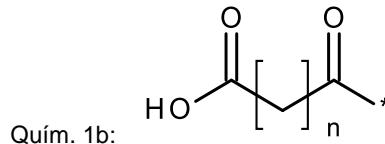
Sustituyentes

- Un sustituyente es un resto unido a un análogo peptídico del EGF(A). De acuerdo con la invención se prefiere que el resto, por ejemplo, el sustituyente no tenga efecto o tenga un efecto mínimo sobre la funcionalidad del péptido del EGF(A) mientras se añaden otras propiedades beneficiosas, tales como una semivida más larga y/o una mejor exposición después de la dosificación oral.
- Sigue que los derivados, así como también los análogos de la invención descritos más arriba, tienen la capacidad de unirse a PCSK9. Tal unión a PCSK9 inhibe la unión de PCSK9 a LDL-R, lo que previene de esta manera la degradación del LDL-R lo que aumenta la eliminación de LDL-C y lipoproteínas aterogénicas.
- En una modalidad específica, los derivados y análogos de la invención tienen una capacidad mejorada para unirse a PCSK9, por ejemplo, en comparación con el LDL-R(293-332) nativo o con otros compuestos de unión a PCSK9. Los análogos y derivados de la invención pueden, por ejemplo, probarse en cuanto a su capacidad para inhibir la unión de PCSK9 al LDL-R mediante el uso del ensayo descrito en el ejemplo D.1.1 en la presente descripción.
- En una modalidad el sustituyente tiene como objetivo mejorar la funcionalidad de los péptidos.
- En una modalidad, el sustituyente aumenta la semivida del análogo peptídico de manera que la semivida plasmática de un derivado que comprende una cadena principal del péptido y un sustituyente tiene un aumento de la semivida en comparación con la semivida de la cadena principal del péptido, como se ilustra en el Ejemplo 1 y 48 (Sección D2, tabla 7). Los métodos para determinar la semivida en diferentes especies se conocen bien en la técnica y se ejemplifican en la presente descripción para ratones y perros (Secciones D2 y D5).
- En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención tiene una semivida más arriba de 4 horas.
- En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención tiene una semivida más arriba de 6 horas, tal como más arriba de 8 horas o tal como más arriba de 10 horas en ratones medida después de una dosificación ya sea por vía subcutánea o intravenosa.
- En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención tiene una semivida más arriba de 25 horas en perros.
- En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención tiene una semivida más arriba de 50 horas, tal como más arriba de 100 horas o tal como más arriba de 150 horas en perros.
- En una modalidad, un sustituyente de extensión de semivida es un resto proteico. En una modalidad tal adicional el resto proteico puede incluir albúmina humana, un dominio Fc o una extensión de proteína no estructurada. En una modalidad adicional el resto proteico puede fusionarse al análogo peptídico. En una modalidad adicional, el resto proteico es el dominio Fc y el dominio Fc se fusiona al análogo peptídico. Cuando se prepara una fusión de Fc el compuesto resultante usualmente será divalente ya que dos polipeptídos Fc formarán un dominio Fc.
- En una modalidad el sustituyente no es un resto proteico. En una modalidad el sustituyente no es un resto proteico fusionado al análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad el resto proteico no es un dominio Fc.
- En otra modalidad el sustituyente es un resto no proteico.
- En una modalidad particular, el sustituyente es capaz de formar complejos no covalentes con albúmina, lo que promueve de esta manera la circulación del derivado dentro de la corriente sanguínea, y también tiene el efecto de prolongar el tiempo de acción del derivado. En una modalidad particular, el sustituyente es capaz de prolongar el tiempo de acción del compuesto EGF(A) sin reducir sustancialmente su capacidad de unión a PCSK9.
- En una modalidad el derivado del EGF(A) comprende un sustituyente de extensión de semivida. Diversos sustituyentes de extensión de semivida se conocen bien en la técnica e incluyen en particular aglutinantes de albúmina que comprenden un grupo de ácido graso como se describió en más detalle más abajo, y tales aglutinantes de albúmina son sustituyentes no proteicos.
- El sustituyente comprende al menos un grupo de ácido graso.
- En una modalidad particular, el grupo de ácido graso comprende una cadena de carbono que contiene al menos 8 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos. En una modalidad el grupo de ácido graso comprende al menos 10 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, tales como al menos 12 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, al menos 14 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, al menos 16 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, al menos 18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos.
- En una modalidad el grupo de ácido graso comprende 8-20 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos. En una modalidad el grupo de ácido graso comprende 10-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos. En una modalidad el grupo de ácido graso comprende

12-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos. En una modalidad el grupo de ácido graso comprende 14-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos.

- 5 En situaciones donde el derivado comprende dos sustituyentes, puede obtenerse un aumento de la semivida con grupos de ácidos grasos más cortos, por lo tanto en una modalidad donde el derivado comprende dos sustituyentes, los grupos de ácido graso pueden comprender al menos 8 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, tal como al menos 10 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, tal como al menos 12 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, al menos 14 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, al menos 16 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos.
- 10 En una modalidad adicional donde el derivado comprende dos sustituyentes, cada uno de los sustituyentes comprende un grupo de ácido graso que comprende 8-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos. En tales modalidades adicionales los grupos de ácido graso comprenden 10-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, tal como 12-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos, tal como 14-18 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos.
- 15 El término "grupo de ácido graso" como se usa en la presente puede referirse como grupo químico que comprende al menos un grupo funcional que es un ácido de Brønsted-Lowry con un $\text{pK}_a < 7$. Los ejemplos no limitantes de tales grupos funcionales que son ácidos de Brønsted-Lowry incluyen un ácido carboxílico (que incluye también carboxifenoxy), un ácido sulfónico, un resto de tetrazol.
- 20 En una modalidad dicho grupo de ácido graso comprende un grupo funcional seleccionado de un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un resto de tetrazol, un resto de metilsulfonilcarbamolamino (MSU) y un resto de 3-hidroxi-isoxazolisoazol. En consecuencia, el sustituyente de extensión de semivida de la invención en una modalidad comprende un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un resto de tetrazol, un resto de metilsulfonilcarbamolamino o un resto de hidroxi-isoxazolisoazol que incluye además 8-20 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos según se define por:
- 25 Quím. 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-*$ en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse como un diácido $\text{C}(n+2)$ o como

30



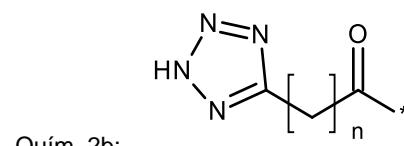
35

, en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20,

40

Quím. 2: 5-tetrazolil- $(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-*$ en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse

45

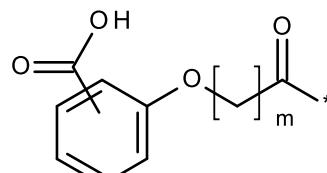


, en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20.

50

Quím. 3: $\text{HOOC}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-*$ en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse

55



Quím. 3b:

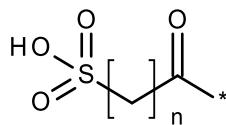
60

en donde el grupo carboxi está en la posición 2, 3 o 4 del grupo (C_6H_4) de Quím. 3 y en donde m es un número entero en el intervalo de 8-11

65

Quím. 4: $\text{HO-S(O)}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-*$ en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse

5

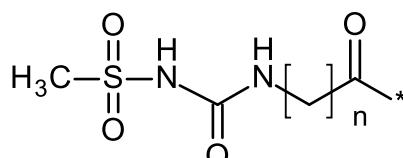


Quím. 4b:

, en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20,

10 Quím. 5: $\text{MeS}(\text{O})_2\text{NH}(\text{CO})\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}^*$ en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse.

15



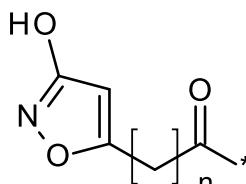
Quím. 5b:

20

, en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20,

25 Quím. 6: 3-HO-Isoxazol-(CH_2)_n-CO- * en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20, que también puede denominarse

25

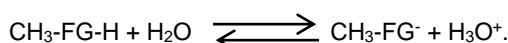


Quím. 6b:

35

, en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20.

El término grupo funcional en su forma ácida se denomina FG-H y su forma como base conjugada se denomina FG $^-$. El término "grupo funcional con un $\text{pK}_a < 7$ " como se usa en la presente puede denominarse un ácido de Brønsted-Lowry que en la forma de su derivado de metilo ($\text{CH}_3\text{-FG-H}$) en solución acuosa tiene un pK_a en equilibrio por debajo de 7, en donde el pK_a es el $-\log$ de la constante de equilibrio (K_a) del equilibrio mostrado más abajo:

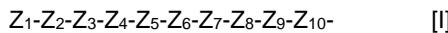


45 Los métodos para la determinación de pK_a se conocen bien en la técnica. Un método tal, por ejemplo, fue descrito por Reijenga y otros en Anal Chem Insights 2013 (2013; 8:53-71).

50 Los sustituyentes de acuerdo con la invención en una modalidad comprenden uno o más elementos enlazadores. Los elementos enlazadores pueden unirse al grupo de ácido graso por uniones amida y denominarse $Z_2\text{-}Z_{10}$. Como se define adicionalmente en la presente descripción más abajo, la cantidad de elementos enlazadores puede ser a lo máximo 10.

En una modalidad específica, el sustituyente es de la Fórmula I:

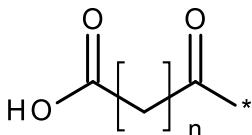
55



en donde Z_1 se selecciona de:

Quím. 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{-CO-}^*$

60



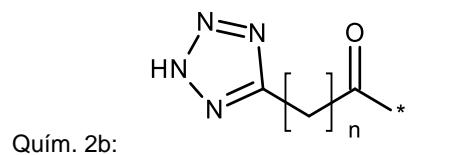
Quím. 1b:

,

65

Quím. 2: 5-tetrazolil-(CH₂)_n-CO-* o

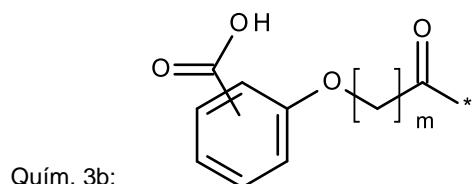
5



10

Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-* o

15

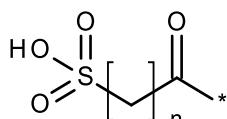


20

, en donde el grupo carboxi está en la posición 2, 3 o 4 de -(C₆H₄)-,

Quím. 4: HOS(O)₂-(CH₂)_n-CO-* o

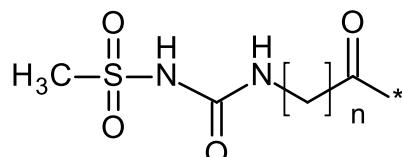
25



30

Quím. 5: MeS(O)₂NH₂N(CO)NHN-(CH₂)_n-CO-* o

35

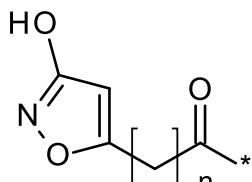


40

y

Quím. 6: 3-HO-Isoxazole-(CH₂)_n-CO-* o

45



50

Quím. 6b:

en donde n es un número entero en el intervalo de 8-20 y m es un entero en el intervalo de 8-11.

55

En una modalidad particular, n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 en Quím. 1 o 1b. En una modalidad particular, n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 en Quím. 2 o 2b. En una modalidad particular, n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 en Quím. 4 o 4b. En una modalidad particular, m es 8, 9, 10 u 11 en Quím. 3 o 3b.

60

En una modalidad particular, n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 en Quím. 5 o 5b.

En una modalidad particular, n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 en Quím. 6 o 6b.

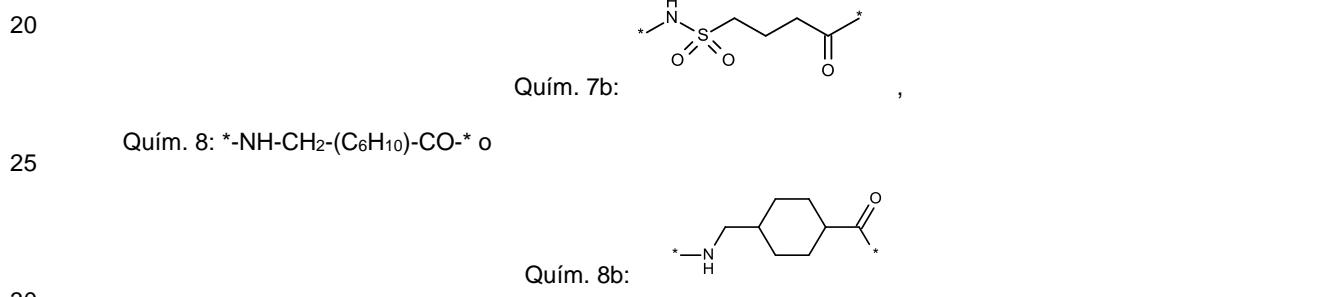
65

En una modalidad particular, el símbolo * indica el punto de unión al nitrógeno en Z₂. En otra modalidad, donde Z₂ es un enlace, el símbolo * indica el punto de unión al nitrógeno del elemento vecino Z.

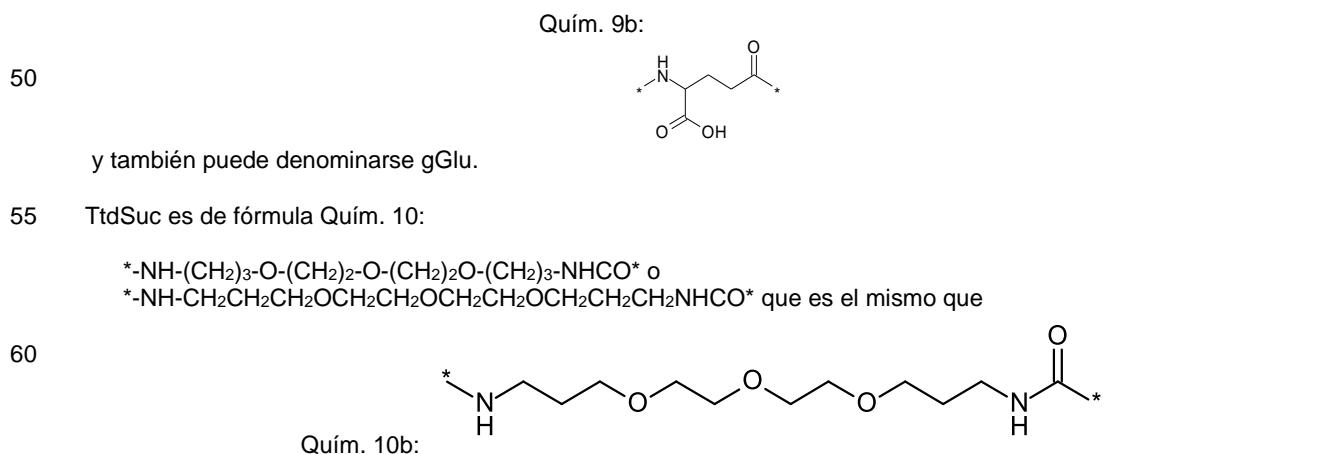
El término "unión" como se usa en el contexto de la Fórmula I significa un enlace covalente. Cuando un componente de la Fórmula I (Z_1-Z_{10}) se define como un enlace, es equivalente a una fórmula I en donde dicho componente está ausente.

- 5 En la presente descripción más abajo se indica que cualquiera de Z_2-Z_{10} es un enlace y también puede leerse como que cualquiera de Z_2-Z_{10} está ausente. Lógicamente "un enlace" no puede seguir a "un enlace". La indicación "un enlace" aquí significa, por lo tanto, que el elemento Z anterior se une covalentemente al siguiente elemento Z que no es "un enlace" (o está ausente).
- 10 Los elementos enlazadores Z_2-Z_{10} se seleccionan a partir de los restos químicos que son capaces de formar enlaces amida, que incluyen restos similares a aminoácidos, tales como Glu, γ Glu (denominada también Glu gammal o gGlu y definida por $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$), Gly, Ser, Ala, Thr, Ado, AEEP, AEEEP y TtdSuc y restos adicionales definidos más abajo.
- 15 Z_2 se selecciona de

Quím. 7: $-\text{NH}-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$ o

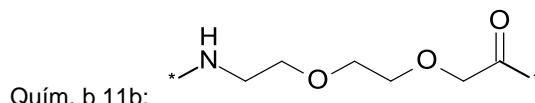


- 30 , y
un enlace.
- 35 Z_3 se selecciona de γ Glu, Glu, o un enlace cuando Z_2 es Quím. 7 o Quím. 7b.
- 40 Z_3 se selecciona de γ Glu, Glu, o un enlace, siempre y cuando Z_3 se selecciona de γ Glu, Glu cuando Z_2 es Quím. 8.
- 45 Z_3 se selecciona de γ Glu y Glu cuando Z_2 es Quím. 8.
- 40 $Z_4, Z_5, Z_6, Z_7, Z_8, Z_9$ se seleccionan, independientemente entre sí, de Glu, γ Glu, Gly, Ser, Ala, Thr, Ado, AEEP, AEEEP, TtdSuc y un enlace.
- 45 Glu, Gly, Ser, Ala, Thr son residuos de aminoácidos conocidos en la técnica.
- 50 γ Glu es de la fórmula Quím. 9: $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ que es el mismo que



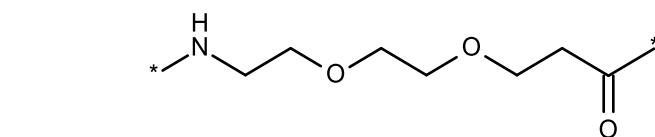
Ado es de fórmula Quím. 11: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ también puede denominarse ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico y el cual es el mismo que

5



10

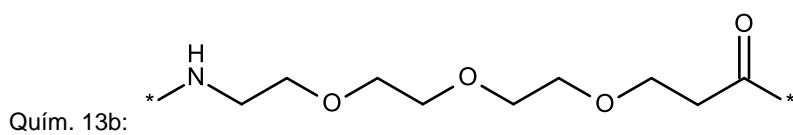
Aeep es de fórmula Quím. 12: $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$, que también puede denominarse



15

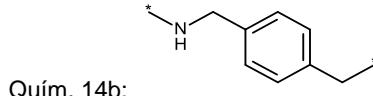
Aeeep es de fórmula Quím. 13: $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$, que también puede denominarse

20



25

Z_{10} se selecciona de un enlace, y Quím. 14: $-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{CH}_2-$, que también puede denominarse



30

En una modalidad particular, cuando Z_{10} es Quím. 14, el sustituyente se une al grupo amino N-terminal de dicho péptido.

En otra modalidad, cuando Z_{10} es un enlace, dicho sustituyente se une a la posición épsilon de un residuo de Lys presente en dicho péptido o al residuo de aminoácido N-terminal de dicho péptido.

35

En una modalidad el derivado comprende dos sustituyentes. En una modalidad tal los dos sustituyentes son idénticos. En una modalidad tal los dos sustituyentes son diferentes. En una modalidad los dos sustituyentes se unen a átomos de nitrógeno del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad los dos sustituyentes están unidos a grupos amino del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad los dos sustituyentes están unidos al aminoácido N-terminal del EGF(A) y a un residuo de Lys del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad, un sustituyente se une al nitrógeno alfa del residuo de aminoácido N-terminal del análogo peptídico del EGF(A) y un sustituyente se une a un residuo de Lys del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad los dos sustituyentes están unidos a un aminoácido N-terminal del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad los dos sustituyentes están unidos a residuos de Lys diferentes del análogo peptídico del EGF(A). En una modalidad, los dos sustituyentes se unen al nitrógeno épsilon de diferentes residuos de Lys en el análogo peptídico del EGF(A).

45

En una modalidad donde están presentes dos sustituyentes, Z_{10} es Quím. 14 en un sustituyente que se une al grupo amino N-terminal de un análogo peptídico y Z_{10} es un enlace en el otro sustituyente que se une a la posición épsilon de un residuo de Lys presente en dicho análogo peptídico.

50

En otra modalidad donde están presentes dos sustituyentes, Z_{10} es un enlace en un sustituyente que se une al grupo amino N-terminal de un análogo peptídico y Z_{10} es un enlace en el otro sustituyente que se une a la posición épsilon de un residuo de Lys presente en dicho análogo peptídico.

55

En otra modalidad donde están presentes dos sustituyentes, Z_{10} es un enlace en ambos sustituyentes y cada uno de los dos sustituyentes se une a la posición épsilon de residuos de Lys diferentes presentes en un análogo peptídico.

En una modalidad particular, los derivados de la invención pueden prepararse a partir de un análogo peptídico del EGF(A) mediante la unión covalente de uno o dos sustituyentes.

60

En una modalidad particular, los dos sustituyentes son de la Fórmula I: $Z_1-Z_2-Z_3-Z_4-Z_5-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}$ [I]. Z_1 a Z_{10} son como se definió más arriba. En una modalidad particular, los dos sustituyentes son de la fórmula I y son idénticos, lo que significa que los Z_1 a Z_{10} seleccionados son iguales en ambos sustituyentes. En otra modalidad, los dos sustituyentes son de la fórmula I y son diferentes, lo que significa que uno o más de los Z_1 a Z_{10} seleccionados son diferentes entre un sustituyente y el otro.

65

Sustituyentes específicos

Como se observa, diversos sustituyentes mencionados más arriba, pueden prepararse por los expertos en la técnica. Los sustituyentes incluidos en la presente solicitud no deben considerarse limitantes de la invención.

En una modalidad el uno o dos sustituyente(s) se selecciona(n) del grupo de sustituyentes que consiste de:

- 5 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-gGlu-2xADO
 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-NH-CH₂-(C₆H₁₀)-CO-gGlu-2xADO
 HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2xADO
 HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu-2xADO-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂
 HOOC-(CH₂)₁₆-CO-gGlu
 HOOC-(CH₂)₁₆-CO-NH-CH₂-(C₆H₁₀)-CO-gGlu-2xADO
 HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-2xADO
 HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-
 15 HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-2xADO-
 HOOC-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-2xADO
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-3xADO
 20 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-2xGlu
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-3xGly
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-2xGlu-2xADO
 25 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-TtdSuc
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₉-CO
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-4xADO
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-NH-CH₂-(C₆H₁₀)-CO-gGlu-2xADO
 30 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₉-CO-gGlu-2xADO
 3-HO-Isoazol-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO
 HOS(O)₂-(CH₂)₁₅-CO-gGlu-2xADO-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂
 HOS(O)₂-(CH₂)₁₃-CO-gGlu-2xADO
 Tetrazolil-(CH₂)₁₅-CO-NH-SO₂-(CH₂)₃-CO-ADO-ADO-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂
 35 Tetrazolil-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO
 Tetrazolil-(CH₂)₁₅-CO-gGlu-2xADO y
 MeS(O)₂NH(CO)NH-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO.

En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 40 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γGlu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*.

En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 45 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γGlu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 14 o 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γGlu; y todos Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

50 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16 o 18; Z₂ es Quím. 8 (Trx); Z₃ es γGlu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

55 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 2: Tetrazolil-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 15; Z₂ es Quím. 7 (sulfonimida); Z₃ es un enlace; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*.

En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 2: Tetrazolil-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 15; Z₂ es un enlace; Z₃ es γGlu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

60 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 2: Tetrazolil-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 12; Z₂ es un enlace; Z₃ es γGlu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

65 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-*, en donde m es 10; Z₂ es un enlace; Z₃ es un enlace; y todos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

- En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y todos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 5 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y uno de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 es una γ Glu y los cinco restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 10 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y uno de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 es una γ Glu y dos son Ado y los tres restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 15 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y tres de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Glu y los tres restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 20 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 25 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y cuatro de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado y los dos restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 30 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es una γ Glu; y uno de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 es un TtdSuc y los cinco restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 35 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es Quím. 8 (Trx); Z_3 es una γ Glu; y dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 40 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 45 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$, en donde m es 10; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 50 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 4: $\text{HO-S(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$, en donde n es 15; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 55 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 4: $\text{HO-S(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$, en donde n es 15; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es Quím. 14: $^*\text{-NH-CH}_2\text{-(C}_6\text{H}_4\text{)-CH}_2\text{-}^*$.
- 60 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 5: $\text{MeS(O)}_2\text{NH(CO)NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$, en donde n es 12; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.
- 65 En una modalidad, el sustituyente es de la Fórmula I en donde Z_1 es Quím. 6: $3\text{-OH-Isoxazol-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-CO-}^*$, en donde n es 12; Z_2 es un enlace; Z_3 es γ Glu; dos de Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 y Z_9 son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z_{10} es un enlace.

Combinaciones de sustituyentes específicos:

En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

5 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 14; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

10 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 14; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; los cuatro de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

15 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-*, en donde m es 10; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

20 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes, donde uno es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*, donde el otro sustituyente es de Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

25 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes, donde uno es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*, donde el otro sustituyente es de Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-*, en donde m es 10; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

30 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes, donde uno es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace; donde el otro sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-*, en donde m es 10; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace.

35 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes, donde uno es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 1: HOOC-(CH₂)_n-CO-*, en donde n es 16; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈, Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace; y el otro sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 4: HOS(O)₂-(CH₂)_n-CO-*, en donde m es 15; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*.

40 En una modalidad, el compuesto de la invención comprende o tiene dos sustituyentes, donde uno es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 3: HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)_m-CO-*, en donde m es 10; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado y los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es un enlace; donde el otro sustituyente es de la Fórmula I en donde Z₁ es Quím. 4: HOS(O)₂-(CH₂)_n-CO-*, en donde m es 15; Z₂ es un enlace; Z₃ es γ Glu; dos de Z₄, Z₅, Z₆, Z₇, Z₈ y Z₉ son Ado, los cuatro restantes son enlaces; Z₁₀ es Quím. 14: *-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-*.

Péptido y sitio de unión

50 Un compuesto o derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención comprende un análogo peptídico del EGF(A) del dominio EGF(A) del LDL-R como se definió mediante la SEQ ID NO: 1. Tal secuencia peptídica se describió más arriba en detalles en la presente descripción y el péptido del derivado o compuesto de la invención puede describirse y definirse mediante términos idénticos. El derivado o compuesto del EGF(A) tiene además al menos un sustituyente como se describió más arriba, en la presente descripción, que se une a la secuencia peptídica.

55 En los compuestos de la invención, el sustituyente se une covalentemente al péptido, lo que significa un residuo de aminoácido de la secuencia peptídica.

En una modalidad el derivado del EGF(A) de la invención, comprende un sustituyente que no se une a ninguna de las siguientes posiciones: 295, 296, 298, 301, 302 y 307. En una modalidad adicional el sustituyente no se une a ninguna de las siguientes posiciones: 295, 296, 298, 301, 302, 307 y 310. En tales modalidades adicionales, este no se une tampoco a ninguna de las siguientes posiciones: 299 y 320.

En una modalidad particular un sustituyente se une a través de cualquier posición de 292 a 333 excepto en cualquiera de las posiciones 297, 304, 308, 317, 319 y 331.

65 En una modalidad particular un sustituyente se une a través de cualquier posición de 292 a 333 excepto en cualquiera de las posiciones 297, 298, 301, 302, 304, 307, 308, 317, 319 y 331.

- En una modalidad particular un sustituyente se une a través de cualquier posición de 292 a 333 excepto en cualquiera de las posiciones 295, 296, 297, 298, 301, 302, 304, 307, 308, 317, 319 y 331. En una modalidad particular un sustituyente unido a través de cualquier posición de 292 a 333 excepto en cualquiera de las posiciones 295, 296, 297, 298, 301, 302, 304, 307, 308, 310, 317, 319, 320 y 331. En una modalidad particular un sustituyente unido a través de cualquier posición de 292 a 333 excepto en cualquiera de las posiciones 295, 296, 297, 298, 301, 302, 304, 307, 308, 309, 310, 317, 319, 320 y 331.
- En una modalidad, el(s) sustituyente(s) se une(n) a cualquiera o dos de las posiciones 292, 293, 294, 299, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332 y 333 del análogo peptídico del EGF(A).
- En una modalidad, la(s) sustitución(ciones) se une(n) a cualquiera o dos de las posiciones 292, 293, 294, 300, 303, 305, 306, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332 y 333 del análogo peptídico del EGF(A).
- En una modalidad, la(s) sustitución(ciones) se une(n) a cualquiera o dos de las posiciones 292, 293, 294, 300, 303, 305, 306, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332 y 333 del análogo peptídico del EGF(A).
- En una modalidad, el sustituyente se une al aminoácido N-terminal de la secuencia peptídico. En una modalidad particular, el aminoácido N-terminal es Gly. En una modalidad particular, el aminoácido N-terminal es 293Gly. En una modalidad particular, el aminoácido N-terminal es 293Lys. En una modalidad particular, el aminoácido N-terminal es 292Lys. También puede ser una Lys o una Gly u otro residuo de aminoácido en la posición N-terminal que puede ser 293 o cualquier posición más lejos del extremo N, tal como 294Thr, 294Gly o 294Lys o 295Asn. En una modalidad particular, el sustituyente se une al nitrógeno alfa del residuo de aminoácido N-terminal del análogo peptídico. En otra modalidad, si el residuo de aminoácido N-terminal es Lys, el sustituyente puede enlazarse covalentemente al nitrógeno alfa o al grupo épsilon amino del residuo de lisina.
- En una modalidad particular, el sustituyente se une al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en el péptido.
- En otra modalidad, un sustituyente se une a una Lys en la posición C-terminal que puede ser la posición 332, 333 o cualquier posición hacia el extremo C.
- En modalidades en donde los péptidos de la invención comprenden un alargamiento, ya sea en N-terminal o en C-terminal, el(s) sustituyente(s) puede(n) unirse a un residuo de aminoácido de dicho(s) alargamiento(s). En presencia de un alargamiento N-terminal, un sustituyente puede unirse al aminoácido N-terminal de dicho alargamiento o a una Lys presente dentro de la secuencia de alargamiento. En presencia de un alargamiento C-terminal, un sustituyente puede unirse a un residuo Lys en la posición C-terminal o a una Lys presente dentro de la secuencia de alargamiento.
- Aún en otra modalidad, el sustituyente se une a un aminoácido presente en la secuencia peptídica. En una modalidad particular, el sustituyente se enlaza a un residuo de lisina presente en el péptido. En una modalidad particular, el sustituyente se enlaza al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina presente en el péptido. El residuo de lisina al que se enlaza el sustituyente puede localizarse en cualquier posición del análogo del EGF(A) LDL-R(293-332) que incluye la posición N-terminal o la posición C-terminal del péptido, cualquier posición dentro de o en el residuo del extremo N-terminal de un alargamiento N-terminal si está presente, cualquier posición dentro de o en el residuo del extremo C-terminal de un alargamiento C-terminal si está presente.
- Como se describió anteriormente en la presente descripción el análogo peptídico del EGF(A) puede tener uno o más residuos de Lys; y esos residuos son útiles para la unión de los sustituyentes.
- En una modalidad particular, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(s) sustituyente(s) se selecciona(n) del grupo de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- En una modalidad particular, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(s) sustituyente(s) se selecciona(n) de 293Lys, 294Lys, 295Lys, 296Lys, 298Lys, 299Lys, 301Lys, 302Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 307Lys, 309Lys, 310Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- En una modalidad particular, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(s) sustituyente(s) se selecciona(n) de 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

En otra modalidad, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(los) sustituyente(s) se selecciona(n) de 293Lys, 294Lys, 298Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

- 5 En otra modalidad, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(los) sustituyente(s) se selecciona(n) de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 299Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- 10 En otra modalidad, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(los) sustituyente(s) se selecciona(n) de: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- 15 En otra modalidad, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(los) sustituyente(s) se selecciona(n) de: 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- 20 En otra modalidad, la(s) lisina(s) a la(s) que se enlaza(n) el(los) sustituyente(s) se selecciona(n) de: 293Lys, 294Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 316Lys, 318Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- 25 En modalidades donde el sustituyente se une a un alargamiento C-terminal, la lisina a la cual se enlaza el sustituyente puede seleccionarse de cualquiera de la posición 333Lys a 242Lys y/o a cualquiera de la posición 333Lys a 383Lys.
- 30 En modalidades donde los compuestos de la invención tienen dos sustituyentes, los sustituyentes pueden enlazarse independientemente entre sí como se definió anteriormente, lo que significa que cualquiera puede unirse al aminoácido N-terminal del péptido, al aminoácido C-terminal del péptido, o a un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido.
- 35 En modalidades donde una Lys está presente en la posición N-terminal, dos sustituyentes pueden estar ambos enlazados a la Lys N-terminal del péptido. Uno puede enlazarse a la amina alfa N-terminal de dicha Lys mientras que el otro puede enlazarse al nitrógeno épsilon de dicha Lys. Cuando dos sustituyentes están presentes, uno puede enlazarse al aminoácido N-terminal del péptido mientras que el otro sustituyente se enlaza a un aminoácido, tal como una Lys, dentro del péptido. Alternativamente, un sustituyente puede enlazarse a una Lys en la posición C-terminal del péptido mientras que el otro sustituyente se enlaza a un aminoácido, tal como una Lys, en el péptido. Alternativamente, un sustituyente puede enlazarse a un residuo de aminoácido, tal como una Lys, dentro del péptido, que incluye alargamientos, el otro sustituyente se une a otro residuo de aminoácido, tal como una Lys, dentro del péptido, que incluye alargamientos.
- 40 En una modalidad, los compuestos de la invención tienen un sustituyente, dicho sustituyente se enlaza al péptido en el N-terminal; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 292Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 293Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 299Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 300Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 309Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 311Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 313Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 314Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 315Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 316Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 318Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 320Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 321Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 323Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 324Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 326Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 328Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 330Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 332Lys; o dicho sustituyente se enlaza al péptido en la posición 333Lys.
- 45 En una modalidad donde el derivado de la invención tiene dos sustituyentes, dichos sustituyentes pueden enlazarse al péptido por medio del N-terminal y cualquiera de las posiciones de Lys mencionadas más arriba, tales como 293Lys, 294Lys, 298Lys, 299Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.
- 50 En modalidades adicionales donde el derivado comprende dos sustituyentes, estos pueden enlazarse a dos residuos de Lys diferentes, tales como cualquiera de los siguientes pares de residuos de Lys
- 55
- | | | | |
|------|-------------|-------|-------------|
| i. | 293K y 294K | xiv. | 313K y 321K |
| ii. | 293K y 312K | xv. | 313K y 324K |
| iii. | 293K y 333K | xvi. | 313K y 328K |
| iv. | 309K y 313K | xvii. | 313K y 332K |

- | | | | | |
|---|-------|-------------|--------|---------------|
| 5 | v. | 309K y 324K | xviii. | 313K y 333K |
| | vi. | 309K y 328K | xix. | 314K y 333K |
| | vii. | 309K y 332K | xx. | 321K y 332K |
| | viii. | 309K y 333K | xi. | 321K y 333K |
| | ix. | 311K y 313K | xxii. | 324K y 333K |
| | x. | 312K y 333K | xxiii. | 324K y 328K |
| | xi. | 312K y 313K | xxiv. | 328K y 333K |
| | xii. | 312K y 314K | xxv. | 330K y 333K y |
| | xiii. | 313K y 314K | xxvi. | 332K y 333K. |
- 10 En una modalidad los dos sustituyentes se unen a través de 333Lys y una Lys seleccionada de 293Lys, 309Lys, 312Lys, 313Lys, 314Lys, 321Lys, 324Lys, 328Lys, 330Lys y 332Lys.
- 15 En una modalidad los dos sustituyentes se unen a través de 333Lys y una Lys seleccionada de 312Lys, 313Lys, 314Lys, 321Lys, 324Lys, 328Lys y 330Lys.
- En una modalidad los dos sustituyentes se unen a través de 333Lys y una Lys seleccionada de 313Lys, 324Lys y 328Lys.
- 20 Como se describió anteriormente el péptido puede tener una o más sustituciones de aminoácidos que pueden combinarse con residuos de aminoácidos específicos en posiciones específicas como se describió en la presente descripción. Tales residuos de aminoácidos específicos pueden ser residuos de aminoácidos wt que deben mantenerse, tal como las cisteínas que en una serie de modalidades preferidas, por ejemplo, en combinación con otras características descritas en la presente descripción, están presentes en el análogo peptídico. En tales modalidades el análogo peptídico comprende tres puentes disulfuro en las posiciones 297Cys-308Cys, 304Cys-317Cys y 319Cys-331Cys. En un ejemplo adicional de tales modalidades el análogo peptídico de un derivado peptídico comprende tres puentes disulfuro en las posiciones 297Cys-308Cys, 304Cys-317Cys y 319Cys-331Cys y al menos un sustituyente, en donde el(s) sustituyente(s) no se une(n) a una posición seleccionada de 295, 296, 298, 301, 302 y 307 de dicho análogo peptídico. El experto comprenderá que las combinaciones de la información de secuencia peptídica pueden combinarse con la información sobre la posición e identidad del sustituyente para definir diversas modalidades específicas de la presente invención.
- 30 En una modalidad, el análogo peptídico no comprende Lys en otras posiciones que las posiciones a las que se enlaza un sustituyente.
- 35 En una modalidad, los compuestos de la invención tienen un sustituyente, dicho sustituyente se enlaza ya sea en la posición N-terminal o a una Lys en cualquier posición, y el análogo peptídico no comprende Lys en todas las otras posiciones. En una modalidad, los compuestos de la invención tienen un sustituyente, dicho sustituyente se une a una Lys en cualquier posición distinta de la posición 312, y el análogo peptídico comprende una Arg en la posición 312Arg.
- 40 En una modalidad, los compuestos de la invención tienen dos sustituyentes, y el análogo peptídico no comprende Lys en posiciones distintas de las posiciones a las que se enlazan los sustituyentes.
- 45 En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención se selecciona del grupo de derivado del EGF(A) que consiste de: Ejemplos 1-47, 51-102 y 106-159.
- 50 En modalidades adicionales el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención se selecciona individualmente del grupo de derivado del EGF(A) que consiste de: Ejemplos 1-47, 51-102 y 106-159.
- 55 En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención se selecciona del grupo de derivado del EGF(A) que consiste de: Los ejemplos 1-44, 46-47, 51-55, 57, 60-64, 66-69, 71-102 y 106-159.
- En una modalidad el derivado del EGF(A) de acuerdo con la invención se selecciona del grupo de derivado del EGF(A) que consiste de: Los ejemplos 31, 95, 128, 133, 143, 144, 150, 151, 152 y 153.
- 55 Composición farmacéutica
- 60 La descripción se refiere, también, a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención, que incluye por ejemplo un análogo peptídico de la invención, o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden prepararse como se conoce en la técnica.
- 65 El término "excipiente" se refiere, en un sentido amplio, a cualquier componente aparte del (de los) ingrediente(s) terapéutico(s) activo(s). El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente. El excipiente puede servir para varios fines, por ejemplo, como portador, vehículo, diluyente,

auxiliar para comprimidos, y/o para mejorar la administración, y/o la absorción de la sustancia activa. Los ejemplos no limitantes de los excipientes son: solventes, diluyentes, amortiguadores, conservantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes quelantes y estabilizadores. En la técnica se conoce la formulación de ingredientes activos farmacéuticamente con diversos excipientes, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo, 19^{na} edición (1995) y cualquiera de las ediciones posteriores).

Una composición puede estar en la forma de una formulación líquida, es decir una formulación acuosa que comprende agua. Una formulación líquida puede ser una solución o una suspensión. Alternativamente, esta puede ser una formulación sólida, por ejemplo una composición secada por congelación o secada por pulverización.

Una composición farmacéutica puede comprender además, un segundo ingrediente activo, tal como un agente terapéutico, que puede simplificar la administración en el caso de tratamientos de combinación.

Una composición puede ser una composición oral, y la vía de administración es oral. Los compuestos y en particular los compuestos de prolongación, es decir los compuestos derivados, son adecuados para la administración oral. Los péptidos y los compuestos están comprendidos en una formulación oral, es decir, una composición adecuada para la administración oral y capaz de proporcionar un nivel adecuado de biodisponibilidad. Pueden usarse tecnologías de formulaciones orales conocidas en la técnica. Esto incluye el uso de sales del ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprílico, en particular el N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC), como se describió en los documentos WO96/30036 y WO2008/028859, y las formulaciones de GIPET que incluyen caprato de sodio, tal como se describió en los documentos EP1154761 y US 8053429.

Para proporcionar compuestos para composiciones orales, los inventores confirmaron que los derivados del péptido EGF(A) de acuerdo con la invención presentan una absorción gastrointestinal en ratas (Tabla 10).

Alternativamente, una composición puede ser para administración parenteral, por ejemplo, realizada por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Naturalmente, los compuestos destinados a la administración subcutánea pueden no necesitar presentar una absorción gastrointestinal, mientras que pueden desearse otras características tales como una alta estabilidad en la formulación líquida.

Tratamiento de combinación

El tratamiento con un análogo o derivado peptídico del EGF(A) también puede combinarse con una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales, por ejemplo, seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas a ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados a ella.

Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: agonistas del receptor GLP-1, insulina, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), agonistas de amilina y agonistas del receptor de leptina. Ejemplos particulares de tales sustancias activas son los agonistas del receptor GLP-1 liraglutida y semaglutida y el insulina degludec.

Indicaciones farmacéuticas

En un aspecto, la descripción se refiere al uso de un análogo peptídico del EGF(A) o un derivado del EGF(A) como se describió en la presente descripción para su uso en la fabricación de un medicamento.

La descripción se refiere, también, a un compuesto de la invención, por ejemplo un análogo peptídico o un derivado de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica del mismo para usar como un medicamento o en la fabricación de un medicamento.

Un compuesto de la invención o una composición de la misma puede usarse para (i) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, disminuir los lípidos séricos totales; disminuir el LDL-C, aumentar el HDL; disminuir las LDL pequeñas y densas; disminuir las VLDL; disminuir los triglicéridos; disminuir el colesterol; disminuir los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)); inhibir la generación de apolipoproteína A (apo(A)); (ii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome cardíaco X, la aterosclerosis, el infarto del miocardio, la cardiopatía coronaria, la lesión por reperfusión, el accidente cerebrovascular, la isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca o cardiovascular precoz, la hipertrofia ventricular izquierda, la enfermedad arterial coronaria, la hipertensión, la hipertensión esencial, la emergencia hipertensiva aguda, la cardiomiopatía, la insuficiencia cardíaca, la intolerancia al ejercicio, la insuficiencia cardíaca aguda y/o crónica, la arritmia, la disritmia cardíaca, el síncope, la angina de pecho, la revascularización cardíaca y/o la reoclusión de la endoprótesis, la claudicación intermitente (aterosclerosis obliterante), la disfunción diastólica y/o la disfunción sistólica; y/o la reducción de la presión arterial, tal como la reducción de la presión arterial sistólica; el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

La descripción también se refiere a un método para (i) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, disminuir los lípidos séricos totales; aumentar el HDL-C; disminuir la LDL-C, disminuir la LDL-C pequeña y densa; disminuir la VLDL-C; disminuir los triglicéridos; disminuir el colesterol; disminuir los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)); inhibir la generación de apolipoproteína A (apo(A)); (ii) la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como el síndrome cardíaco X, la aterosclerosis, el infarto del miocardio, la enfermedad cardíaca coronaria, la lesión por reperfusión, el accidente cerebrovascular, la isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca o cardiovascular precoz, la hipertrofia ventricular izquierda, la enfermedad arterial coronaria, la hipertensión, la hipertensión esencial, la emergencia hipertensiva aguda, la cardiomiopatía, la insuficiencia cardíaca, la intolerancia al ejercicio, la insuficiencia cardíaca aguda y/o crónica, la arritmia, la disritmia cardíaca, el síncope, la angina de pecho, la revascularización cardíaca y/o la reoclusión de la endoprótesis, la claudicación intermitente (aterosclerosis obliterante), la disfunción diastólica y/o la disfunción sistólica; y/o reducción de la presión arterial, tal como la reducción de la presión arterial sistólica; el tratamiento de enfermedades cardiovasculares; en donde se administra una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de acuerdo con la invención, por ejemplo, un análogo peptídico o un derivado de acuerdo con la invención.

Aunque determinadas características de la invención se ilustran y describen en la presente descripción, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para los expertos en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones adjuntas pretenden cubrir todas esas modificaciones y cambios.

20 Ejemplos

Esta parte experimental comienza con una lista de abreviaturas y le continúa una sección que incluye los métodos generales para sintetizar y caracterizar los análogos y derivados de la invención. Después sigue un número de 25 ejemplos que se refieren a la preparación de compuestos específicos del EGF(A) de la invención, que incluyen análogos y derivados, y al final se incluye un número de ejemplos relacionados con la actividad y las propiedades de estos compuestos (sección titulada métodos farmacológicos).

30 Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Lista de abreviaturas

AcOH:	ácido acético
Ado:	ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
35 AEEP:	ácido 9-amino-4,7-dioxanonoico
AEEEP:	ácido 12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoico
Alloc:	Aliloxicarbonilo
API:	Ingrediente Farmacéutico Activo
AUC:	Área Bajo la Curva
40 BG:	Glucosa en Sangre
Boc:	t-butiloxicarbonilo
BSA:	Albúmina sérica bovina
Clt:	2-clorotritilo
colidina:	2,4,6-trimetilpiridina
45 DCM:	dclorometano
Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo
DIC:	diisopropilcarbodiimida
DIPEA:	diisopropiletilamina
50 DMAP:	4-dimetilaminopiridina
EGF:	Similar al factor de crecimiento epidérmico
EGF(A):	Dominio A similar al factor de crecimiento epidérmico
F (Tabla 5):	Biodisponibilidad
Fmoc:	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HDL:	Lipoproteína de alta densidad
55 HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanósulfónico
HFIP:	1,1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol o hexafluoroisopropanol
HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
hPCKS9:	PCSK9 humano
60 HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSA:	Albúmina sérica humana
IC ₅₀ :	concentración inhibitoria máxima media
Inp:	ácido isonipecótico
i.v.	por vía intravenosa
65 ivDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo
LCMS:	Cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas

	LDL-R o LDLr:	Receptor de la LDL
	LDL:	lipoproteína de baja densidad
	LDL-C:	Colesterol LDL
	MeOH:	metanol
5	Mmt:	4-metoxitritilo
	Mtt:	4-metiltritilo
	MRT:	Tiempo medio de residencia
	MSU:	Metilsulfonilcarbamoolamino
	NMP:	N-metil pirrolidona
10	OBz:	éster de benzoilo
	Ado:	ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico
	OSu:	Ésteres de O-succinimidilo (ésteres de hidroxisuccinimida)
	OtBu:	éster terc butílico
	Oxyma Pure®:	Éster etílico de ácido ciano-hidroxiimino-acético
15	Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
	PD:	Farmacodinámica
	PK:	Farmacocinética
	QC:	Control de calidad
20	RP:	Fase inversa
	RP-HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa
	RT:	Temperatura ambiente
	Rt:	Tiempo de retención
	s.c.:	Vía subcutánea
25	SD:	Desviación estándar
	SEM:	Error estándar de la media
	SPPS:	Síntesis de péptidos en fase sólida
	tBu:	terc butilo
	TFA:	ácido trifluoroacético
30	TIS o TIPS:	triisopropilsilano
	Tmáx:	tiempo para alcanzar la Cmáx
	Tris:	tris(hidroximetil)aminometano o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
	Trt:	trifenilmetilo (tritilo)
	Trx:	ácido tranexámico
35	UPLC:	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
	TBS-T:	Solución salina tamponada con Tris

Métodos químicos

40 Esta sección se divide en tres: La sección A, relacionada con los métodos generales de preparación de los compuestos de la invención, la sección B, relacionada con la preparación de un número de compuestos específicos de la invención, y la sección C, relacionada con los métodos de detección y caracterización de los compuestos de la invención y los resultados de un número de compuestos específicos de los ejemplos.

45 A. Métodos de preparación

Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante el método descrito más abajo.

Preparación del péptido, es decir el péptido EGF(A) de la SEQ ID NO: 1 o análogos del mismo:

50 Métodos Generales de SPPS:

Los aminoácidos protegidos con Fmoc a usar pueden ser el estándar recomendado: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Lys(Mtt)-OH o Fmoc-Lys(Alloc)-OH suministrados, por ejemplo, por Anaspec, Bachem, Iris Biotech o NovabioChem. La SPPS puede realizarse mediante el uso de química basada en Fmoc en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 EE.UU.). Una resina adecuada para la preparación de los ácidos carboxílicos C-terminales es una resina Wang precargada con un aminoácido tal como Fmoc-Glu(tBu)-resina Wang (Carga Baja, 0,35 mmol/g). En casos donde el sustituyente se une a una lisina C-terminal, una resina adecuada es una Fmoc-Lys(Mtt)-Wang pre-cargada. Una resina adecuada para la preparación de amidas peptídicas C-terminales es la resina H-Rink Amide-ChemMatrix (que carga, por ejemplo, 0,52 nmol/g) o la resina de poliestireno Rink Amide AM (Novabiochem, que carga, por ejemplo, 0,62 mmol/g) o similares. La eliminación de la protección con Fmoc se logra con piperidina al 20 % en NMP. Los acoplamientos de los péptidos se realizan mediante el uso de DIC/HOAt/colidina o DIC/Oxyma Pure con o sin colidina con o sin preactivación o mediante el uso de DEPBt (3-

(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona) /DIPEA para la supresión de la epimerización de, por ejemplo, la His durante el acoplamiento. Las soluciones de aminoácido/HOAt o aminoácido/Oxima Pura (0,3 M/0,3 M en NMP a un exceso molar de 3-10 veces) se añadieron a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) seguido por colidina (3 M en NMP). Por ejemplo, pueden usarse las cantidades siguientes de solución de aminoácido/HOAt 0,3 M por acoplamiento para las siguientes reacciones en escala: Escala/ml, 0,05 mmol/1,5 ml, 0,10 mmol/3,0 ml, 0,25 mmol/7,5 ml.

Si se usa Fmoc-Lys(Mtt)-OH, el grupo Mtt puede retirarse mediante lavado de la resina con HFIP/DCM (75:25) (2 x 2 min), lavado con DCM y suspensión de la resina en HFIP/DCM (75:25)(2 x 20 min) y lavado subsecuente antes de que el sustituyente pueda introducirse en la posición épsilon del resto de lisina.

Si se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH, el grupo Alloc puede retirarse mediante tratamiento de la resina con Pd(PPh₃)₄ (0,02 equiv.) en presencia de uno o más limpiadores en combinación con, por ejemplo morfolina (6,0 equiv.) y/o complejo de dimetil borano (18,0 equiv.) (30 min). La resina se lava después con MeOH, NMP o DMF e IPA (alcohol isopropílico), respectivamente, antes de que el sustituyente pueda introducirse en la posición épsilon del resto de lisina.

Unión del sustituyente (Acilación)

El sustituyente puede introducirse en un procedimiento por etapas en el sintetizador de péptidos Prelude como se describió anteriormente mediante el uso de bloques constitutivos protegidos adecuadamente, tal como los aminoácidos estándar descritos más arriba, ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico o Fmoc-Glu-OtBu. La introducción del sustituyente puede lograrse mediante el uso de un bloque constitutivo, tal como éster mono-terc-butilico del ácido octadecanodioico. Despues de cada etapa de acoplamiento, el intermedio peptídico sin reaccionar puede taponarse mediante el uso de anhídrido de ácido acético y colidina en exceso (> 10 eq.).

La introducción de un sustituyente en el nitrógeno épsilon de una lisina se logra mediante el uso de una lisina protegida con Mtt (Fmoc-Lys(Mtt)-OH), Alloc (Fmoc-Lys(Alloc)-OH) o un grupo ivDde (Fmoc-Lys(ivDde)-OH). La incorporación de restos de γ Glu en el sustituyente puede lograrse mediante el acoplamiento con el aminoácido Fmoc-Glu-OtBu.

La introducción de cada resto en el sustituyente puede lograrse mediante el uso de un tiempo de acoplamiento prolongado (1 x 6 horas), seguido del taponado con anhídrido acético o, alternativamente, con ácido acético/DIC/HOAt/colidina.

Escisión de la resina

Después de la síntesis la resina se lava con DCM, y el péptido se escinde de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIPS/agua (95/2,5/2,5) o TFA/EDT (1,2-etanoditiol)/agua (90/5/5) seguido por precipitación con Et₂O (éter dietílico). El precipitado se lava con Et₂O.

Plegamiento oxidativo

El precipitado de la etapa más arriba se disuelve en DMSO y se añade a una solución que consiste de:

TRIS 5 mM

CaCl₂ 5 mM

Cisteína 3 mM

Cistina 0,3 mM

en agua MQ, pH 8 a 8,8

La mezcla de reacción se mantiene durante toda la noche a temperatura ambiente o hasta que LCMS muestre que la reacción se completó.

Purificación y cuantificación

El péptido bruto (derivado) se acidifica con TFA a pH 2-3 y se purifica mediante HPLC preparativa de fase inversa (Waters Deltaprep 4000 o Gilson) en una columna que comprende gel de sílice C8- o C18-. La elución se realiza con un gradiente en aumento de MeCN en agua que comprende TFA al 0,1 %. Las fracciones relevantes se revisan mediante HPLC o UPLC analítica. Las fracciones que comprenden el derivado peptídico objetivo puro se mezclan. Una etapa de purificación adicional puede introducirse mediante el uso de otro gradiente, por ejemplo que contiene NH₄HCO₃ 0,05 M. La solución resultante se analiza (HPLC, LCMS) y el producto (es decir, el derivado) se cuantifica mediante el uso de un detector de quimioluminiscencia específico para nitrógeno de HPLC (Antek 8060 HPLC-CLND) o mediante la medición de la absorción UV a 280 nm. El producto se dispensa en frascos de vidrio. Los frascos se tapan con prefiltros de fibra de vidrio Millipore. El secado por congelación proporciona el trifluoroacetato peptídico como un sólido blanco.

Unión del sustituyente (Alquilación reductiva)

El análogo peptídico purificado puede someterse a alquilación reductiva mediante el uso de un sustituyente adecuado de unión a la albúmina derivatizado con una funcionalidad aldehído.

5 El análogo peptídico se disuelve en ácido cítrico pH = 5,5 y un aldehído adecuado se disuelve en agua que puede contener ciclodextrina para aumentar la solubilidad. Se añade un agente reductor tal como el complejo de borano piridina disuelto en MeOH y la mezcla se agita suavemente durante toda la noche. Puede requerirse una adición subsecuente de un exceso del aldehído y el agente reductor para un rendimiento óptimo. La mezcla se purifica mediante el uso del procedimiento descrito más arriba.

10 B. Síntesis de compuestos de la invención

15 Los compuestos de la invención se prepararon mediante un método no esencialmente diferente de los métodos generales descritos más abajo.

Método A

20 Síntesis de análogos peptídicos del LDL-R(293-332) (sin sustituyente)

25 Los aminoácidos protegidos con Fmoc usados fueron los estándares recomendados: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, BOC-Lys(Fmoc)-OH Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Lys(Mtt)-OH suministrados, por ejemplo, por Anaspec, Bachem, Iris Biotech, o NovabioChem. La SPPS se realizó mediante el uso de química basada en Fmoc en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude de Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 EE.UU.). Se usó una resina Wang precargada con un aminoácido tal como Fmoc-Glu(tBu)-resina Wang (Carga Baja, 0,35 mmol/g) o similares. La desprotección del Fmoc se logró con piperidina al 20 % en NMP. Los acoplamientos de los péptidos se realizaron mediante el uso de DIC/Oxyma Pura con colidina.

30 Las soluciones de aminoácido/Oxyma Pura (0,3 M/0,3 M en DMF a un exceso molar de 3-10 veces) se añadió a la resina seguido por el mismo equivalente molar de DIC (3 M en NMP) seguido por colidina (3 M en NMP).

Escisión de la resina

35 Despues de la síntesis la resina se lavó con DCM, y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2-3 horas con TFA/TIPS/DTT/agua (92,5/2,5/2,5/2,5) seguido por precipitación con éter dietílico. El precipitado se lavó subsecuentemente con éter dietílico.

40 Plegamiento oxidativo

45 El precipitado de la etapa más arriba se disolvió en DMSO y se añadió a una solución que consistió de:

TRIS 50 mM
CaCl₂ 5 mM
Cisteína 3 mM
Cistina 0,3 mM
en agua MQ, pH 8,0 a 8,8

50 La mezcla de reacción se mantuvo durante toda la noche a temperatura ambiente o hasta que LCMS mostró que la reacción se completó.

55 Purificación y cuantificación

El péptido bruto se acidificó con TFA a pH 2-3 y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Waters DeltaPrep 4000 o Gilson) en una columna que comprende gel de sílice C8- o C18-. La elución se realizó con un gradiente en aumento de MeCN en agua que comprende TFA al 0,1 %. Las fracciones relevantes se analizaron mediante el uso de UPLC. Las fracciones que comprenden el péptido objetivo puro se combinaron. La solución resultante se analizó (UPLC, LCMS) y el derivado peptídico se cuantificó mediante el uso de un detector de HPLC específico de nitrógeno quimioluminiscente (Antek 8060 HPLC-CLND) o mediante la medición de la absorción UV a 280 nm. El producto se dispuso en frascos de vidrio. Los frascos se taparon con prefiltros de fibra de vidrio Millipore. El secado por congelación proporcionó la sal de trifluoroacetato peptídico como un sólido blanco.

60 Método B

65 Síntesis de los derivados de análogos del EGF(A) del LDL-R(293-332) (con sustituyente) (en resina)

La síntesis del péptido EGF(A) unido a la resina procedió como se describió anteriormente.

La introducción de un sustituyente en el nitrógeno épsilon de una lisina en el N-terminal de la secuencia se logró mediante el uso de Boc-Lys(Fmoc)-OH. La introducción del sustituyente en la posición alfa del aminoácido N-terminal se llevó a cabo mediante el uso de un aminoácido protegido con Fmoc estándar, es decir, Fmoc-Gly-OH.

Para la introducción de un sustituyente en el nitrógeno épsilon de una lisina en otras posiciones, se usó Fmoc-Lys(Mtt)-OH. El grupo Mtt se retiró mediante tratamiento con HFIP/DCM (75:25) (2 x 2 min), seguido por un lavado con DCM. La resina se resuspendió después en HFIP/DCM (75:25)(2x20 min o 2x30 min) y subsecuentemente se lavó con DCM antes que el sustituyente se introdujera en la posición épsilon del resto de lisina.

Los restos del sustituyente se introdujeron en un procedimiento por etapas mediante un sintetizador de péptidos Prelude como se describió en el método A, mediante el uso de bloques constitutivos protegidos adecuadamente, tal como los aminoácidos protegidos con Fmoc estándar descritos en el método A, ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico o Fmoc-Glu-OtBu. La introducción del grupo de ácido graso se logró mediante el uso del bloque constitutivo adecuado, tal como el éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodoico. En algunos casos se aumentó el tiempo de acoplamiento o se repitió la etapa de acoplamiento para cada bloque constitutivo.

La escisión, el plegamiento oxidativo, la purificación y la cuantificación se realizaron como se describió en el método A.

Método C

Unión del sustituyente en solución (por medio de alquilación reductiva)

El péptido purificado obtenido del método A se sometió a alquilación reductiva mediante el uso de un sustituyente adecuado derivatizado con una funcionalidad aldehído.

El polvo del péptido secado por congelación se disolvió en un tampón de ácido cítrico (40 mM, pH 5,55; concentración del péptido: 4 mg/ml). Una solución que comprende el sustituyente seleccionado (10 eq., 10 mg/ml) en ciclodextrina acuosa al 40 % (p/v) se añadió a la solución del péptido y se mezcló suavemente mediante inversión del frasco de reacción. A esta solución se añadió el complejo de borano piridina (100 eq., solución de 80 mg/ml en MeOH) en alícuotas pequeñas, seguido por inversión suave del frasco de reacción. La solución de reacción se agitó suavemente a temperatura ambiente durante toda la noche. El progreso de la reacción se monitoreó mediante LC-MS. A la mañana siguiente, la solución de reacción se acidificó a pH 2-3 mediante el uso de TFA y se purificó mediante el uso del procedimiento descrito más arriba en el método A.

Método D

Unión del sustituyente (acilación del N-terminal del péptido plegado en solución)

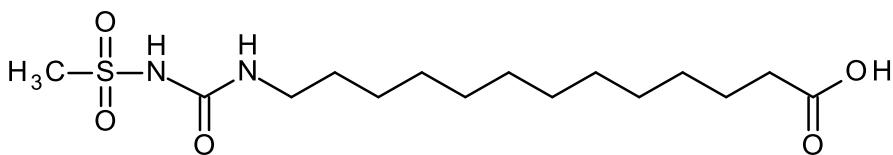
El polvo del péptido secado por congelación se disolvió en tampón K₂HPO₄ (20 mM, pH 8,15) a una concentración objetivo de 5 mg/ml. Una solución del ácido 18-[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-ethoxy]ethoxy]ethylamino]-2-oxo-ethoxy]ethoxy]ethylamino]-4-oxo-butyl]amino]-18-oxo-octadecanoico en DMSO (4 eq.; 4 mg/ml) se añadió en cuatro alícuotas. Después de la adición de cada alícuota la solución del péptido se mezcló suavemente mediante inversión del frasco de reacción. Subsecuentemente, el valor de pH de la solución de reacción se midió y se ajustó a pH 8,0-8,3 mediante la adición de porciones pequeñas de N,N-diisopropiletilamina, después de lo cual la solución se dejó en reposo a temperatura ambiente. La progresión de la reacción se siguió por LC-MS. Después de tres horas la solución se acidificó a pH 5,9 con TFA y se purificó mediante el uso del procedimiento descrito más arriba.

B.1. Síntesis de prolongadores y elementos enlazadores

Para la síntesis del éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodoico: véase la solicitud de patente WO 2010102886. Los ésteres mono-terc-butílicos correspondientes de diácido de C14-, C16- y C20 pueden prepararse en consecuencia. Para la síntesis del ácido 14-sulfo-hexadecanoico o ácido 16-sulfo-hexadecanoico sulfónico véase el documento WO2015071355. Para la síntesis del ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico y ácido 13-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico véase el documento WO2006005667.

Ácido 13-(metilsulfonilcarbamolamino)tridecanoico.

Quím. 6-OH, en donde n=12:



10 Esta molécula se hizo mediante el uso de un procedimiento modificado de Luckhurst y otros. Tetrahedron Letters, volumen 48, número 50, 2007, páginas 8878-8882 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.10.046>

15 Subsecuentemente se añadieron trietilamina (4,46 ml, 32,0 mmol) y cloroformiato de etilo (3,05 ml, 32,0 mmol) a una solución del ácido 14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanoico (1, C14(OtBu)-OH, 6,29 g, 20,0 mmol) en acetona (176 ml) a 0 °C. Después de 30 minutos a 0 °C, se añadió una solución de azida de sodio (2,60 g, 40,0 mmol) en agua (12 ml) y la mezcla se agitó durante 2 horas a 0 °C. La mezcla se concentró al vacío (a 30 °C) y se vertió en agua con hielo (300 ml). La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 ml); los extractos orgánicos se combinaron y lavaron con agua (200 ml), solución acuosa al 10 % de hidrogenocarbonato de sodio (200 ml) y agua (200 ml); se secaron sobre sulfato de magnesio anhídrico y se evaporaron hasta la sequedad para dar una mezcla de 14-azido-14-oxotetradecanoato de terc-butilo y 14-isocianato-14-oxotetradecanoato de terc-butilo como un aceite amarillo pálido.

20 Se añadieron metanosulfonamida (1,52 g, 16,0 mmol), carbonato de potasio (6,63 g, 48,0 mmol) a una solución de la mezcla de 14-azido-14-oxotetradecanoato de terc-butilo y 14-isocianato-14-oxotetradecanoato de terc-butilo (5,43 g, 16,0 mmol) en tolueno seco (50 ml). La mezcla de reacción se calentó a 85 °C durante toda la noche. Se añadió agua (100 ml) seguido por ácido clorhídrico acuoso 1 M (el pH se ajustó a pH=4). La mezcla se extrajo con éter dietílico (4 x 150 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhídrico y se evaporó al vacío para dar 13-(3-(metilsulfonil)ureido)tridecanoato de terc-butilo.

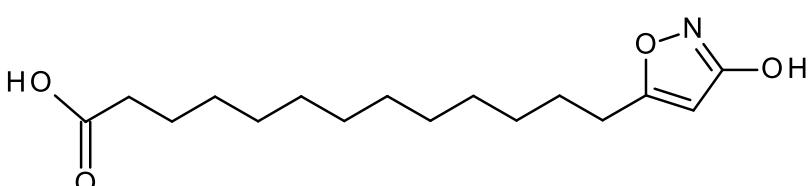
30 Espectro de RMN 1H (300 MHz, DMSO, dH): 10,01 (s, 1 H); 6,42 (t, J=4,7 Hz, 1 H); 3,20 (s, 3 H); 3,02 (q, J=6,7 Hz, 2 H); 2,16 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 1,52-1,33 (m, 13 H); 1,30-1,11 (m, 16 H).

35 Se añadieron ácido trifluoroacético (21,0 ml) y agua (2,50 ml) por goteo a una solución de 13-(3-(metilsulfonil)ureido)tridecanoato de terc-butilo (3, 6,30 g, 15,5 mmol) en diclorometano (30 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El solvente se evaporó a presión reducida, para producir ácido 13-(3-(metilsulfonil)ureido)tridecanoico.

40 Espectro de RMN 1H (300 MHz, DMSO, dH): 10,02 (s, 1 H); 6,43 (t, J=4,5 Hz, 1 H); 3,20 (s, 3 H); 3,02 (q, J=6,6 Hz, 2 H); 2,18 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 1,56-1,33 (m, 4 H); 1,24 (s, 16 H).

45 Ácido 13-(3-hidroisoxazol-5-il)tridecanoico

50 Quím. 5-OH, en donde n=12:



55 Esta molécula se hizo mediante el uso de un procedimiento modificado de Sørensen y otros. J. Org. Chem., 2000, 65 (4), pp 1003-1007. DOI: 10.1021/jo991409d

60 Se disolvieron ácido 14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanoico (1, 30,0 g, 95,4 mmol), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (43,3 g, 209 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (25,6 g, 20,9 mmol) en diclorometano anhídrico (700 ml) y se añadió 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (2, 20,6 g, 143 mmol) a la solución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Los compuestos volátiles se evaporaron después y la mezcla se diluyó con éter dietílico (500 ml) y se filtró un precipitado blanco. El filtrado se concentró a presión reducida, se diluyó con éter dietílico (300 ml) y se extrajo con ácido clorhídrico acuoso 1 M (3 x 100 ml) y salmuera (1 x 100 ml). La porción orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida para dar 14-(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-il)-14-oxotetradecanoato de terc-butilo como un aceite amarillo. El producto bruto se usó para la próxima etapa sin purificación adicional.

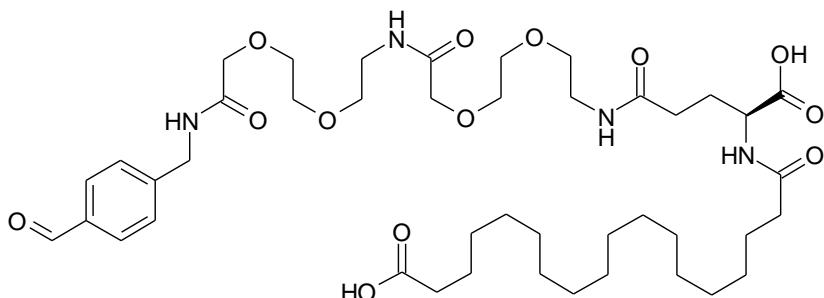
65 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl3, dH): 3,07 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,20 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,74 (s, 6 H); 1,71-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,36-1,23 (m, 16 H).

El producto bruto mencionado más arriba se disolvió en etanol (300 ml) y la solución resultante se agitó a 80 °C durante 3 horas y después durante toda la noche a temperatura ambiente. El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0,040–0,063 mm; eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 9:1) para dar 1-etyl 16-metil 3-oxohexadecanodioato como un aceite incoloro

- 5 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 4,21 (q, J=7,2 Hz, 2 H); 3,44 (s, 2 H); 2,54 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,21 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,67-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,38-1,21 (m, 19 H).
- 10 El hidróxido de sodio (1,09 g, 27,3 mmol) se disolvió en metanol (40,0 ml) y agua (10,0 ml) a - 30 °C bajo atmósfera de argón. El éster mencionado más arriba (4, 10,0 g, 26,0 mmol) se disolvió en metanol (40 ml) y dimetoxietano (50 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a - 30 °C. Después de 20 minutos, se añadió gota a gota una solución de clorhidrato de hidroxilamina (3,61 g, 52,0 mmol) e hidróxido de sodio (2,18 g, 54,6 mmol) en dimetoxietano (10 ml) y agua (10,0 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a - 30 °C. Después la mezcla se inactivó con acetona (5 ml) y después de 5 minutos se vertió de una vez en ácido clorhídrico concentrado (70 ml) y se calentó a 80 °C durante 70 minutos. Después se retiraron todos los volátiles a presión reducida, se disolvieron los sólidos con diclorometano (400 ml) y se extrajeron con agua destilada (100 ml) y salmuera (70 ml). La porción orgánica se secó con sulfato de sodio. El producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0,040–0,063 mm; eluyente: ciclohexano/acetato de etilo 3:1) para dar 13-(3-hidroxiisoxazol-5-il)tridecanoato de metilo como un sólido blanco.
- 15 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 5,66 (s, 1 H); 3,67 (s, 3 H); 2,63 (t, J=7,6 Hz, 2 H); 2,31 (t, J=7,6 Hz, 1 H); 1,72-1,55 (m, 4 H); 1,40-1,19 (m, 16 H).
- 20 Se disolvió 13-(3-hidroxiisoxazol-5-il)tridecanoato de metilo (5, 6,20 g, 19,9 mmol) en metanol (60,0 ml) y agua (20,0 ml), se añadió hidróxido de litio monohidratado (4,04 g, 96,3 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Después se retiraron los volátiles a presión reducida y se añadió agua (50,0 ml) seguida de ácido clorhídrico acuoso 1 M (50,0 ml). El precipitado se filtró y se lavó con agua (2 x 100 ml) y después se secó a presión reducida para dar ácido 13-(3-hidroxiisoxazol-5-il)tridecanoico como un sólido beige.
- 25 Espectro de RMN 1H (300 MHz, DMSO-d₆, dH): 5,74 (s, 1 H); 2,57 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,18 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,63-1,41 (m, 4 H); 1,34-1,14 (m, 16 H).

B.2 Síntesis de precursores de sustituyentes intermedios para la alquilación reductiva

- 30 Ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[4-formilfenil]methilamino]-2-oxo-etoxy]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxy]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico



- 35 40 45 50 55 60 65 La resina de 2-clorotritilo de malla 100-200 (42,6 g, 42,6 mmol) se dejó inflar en diclorometano seco (205 ml) durante 20 minutos. Se añadió a la resina una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxy]-etoxy}-acético (13,7 g, 35,5 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (23,5 ml, 135 mmol) en diclorometano seco (30 ml) y se agitó la mezcla durante 3 horas. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (12,4 ml, 70,9 mmol) en una mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 250 ml, 2 x 5 min). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (200 ml, 2 x 150 ml). La solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxy]-etoxy}-acético (20,5 g, 53,2 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 18,9 g, 53,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (16,7 ml, 95,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) y diclorometano (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (155 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (200 ml, 2 x 150 ml). La solución de Fmoc-Glu-OtBu (22,6 g, 53,2 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 18,9 g, 53,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (16,7 ml, 95,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (155 ml) se añadió a la

resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (150 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (2 x 150 ml) y diclorometano (200 ml, 2 x 150 ml). La solución de éster

5 mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico (19,7 g, 53,2 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 18,9 g, 53,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (16,7 ml, 95,7 mmol) en mezcla de N,N-dimetilformamida/diclorometano (1:4, 200 ml) se añadió a la resina. La resina se agitó durante 2 horas, se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), diclorometano (2 x 150 ml), metanol (2 x 150 ml) y diclorometano (300 ml, 6 x 150 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (200 ml) durante 19 horas. La resina se filtró y lavó con diclorometano (2 x 150 ml), mezcla de 2-propanol/diclorometano (1:1, 2 x 150 ml), 2-propanol (150 ml) y diclorometano (2 x 150 ml). Las soluciones se combinaron; el solvente se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 1:0-9:1). El producto puro se secó al vacío y se obtuvo como un aceite amarillo.

15 Rendimiento del éster terc-butílico del ácido 17-((S)-1-terc-butoxicarbonil-3-[2-(2-{[2-(2-carboximetoxi-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-metoxi}-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-propilcarbamoyl)-heptadecanoico: 25,85 g (86 %).

RF (SiO₂, cloroformo/metanol, 85:15): 0,25.

20 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,38 (bs, 1 H); 7,08 (bs, 1 H); 6,61 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 4,43 (m, 1 H); 4,15 (s, 2 H); 4,01 (s, 2 H); 3,78-3,39 (m, 16 H); 2,31 (t, J=6,9 Hz, 2 H); 2,27-2,09 (m, 5 H); 2,01-1,84 (m, 1 H); 1,69-1,50 (m, 4 H); 1,46 (s, 9 H); 1,43 (s, 9 H); 1,24 (bs, 24 H).

LC-MS m/z: 846,6 (M+H)+.

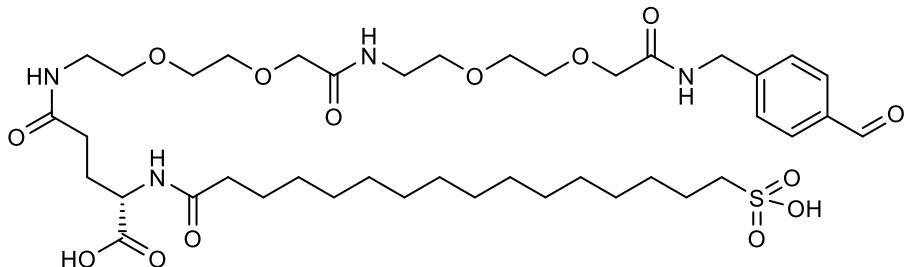
25 El éster terc-butílico del ácido (4-formil-bencil)-carbámico (Boc-aminometilbenzaldehído, 1,54 g, 6,60 mmol) se disolvió en diclorometano (50 ml) y se añadió una solución de ácido clorhídrico en dioxano (3,8 M, 20 ml, 76 mmol). La mezcla se agitó durante 16 horas y un material sólido precipitó de la solución. Todos los solventes se retiraron mediante evaporación. Se añadieron éster terc-butílico del ácido 17-{(S)-1-terc-butoxicarbonil-3-[2-(2-{2-carboximetoxi-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-methoxy]-ethoxy)-ethylcarbamoyl}-propylcarbamoyl-heptadecanoico (5,08 g, 6,00 mmol), clorhidrato de etil-(N',N'-dimetilamino)propylcarbodiimida. (EDC, 1,73 g, 9,00 mmol), N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,037 g, 0,30 mmol) y diclorometano (50 ml). La mezcla se agitó y se añadió diisopropiletilamina (2 ml, 11,6 mmol) en 3 porciones. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas y los solventes se evaporaron. El residuo se disolvió en diclorometano (10 ml) y una solución de ácido clorhídrico se añadió gota a gota hasta que el pH fue menor que 5. 30 La solución se sometió a cromatografía en columna (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar el sustituyente como un aceite amarillo. 35

Rendimiento: 3,15 g (54 %).

40 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 9,99 (s, 1 H); 7,85 (d, J=7,9 Hz, 2 H); 7,54-7,43 (m, 3 H); 7,06 (t, J=5,5 Hz, 1 H); 6,86 (t, J=5,6 Hz, 1 H); 6,48 (d, J=7,7 Hz, 1 H); 4,58 (d, J=6,2 Hz, 2 H); 4,45-4,36 (m, 1 H); 4,09 (s, 2 H); 3,94 (s, 2 H); 3,73-3,37 (m, 16 H); 2,32-2,05 (m, 7 H); 1,99-1,80 (m, 1 H); 1,69-1,51 (m, 4 H); 1,45 (s, 9 H); 1,44 (s, 9 H); 1,33-1,20 (m, 24 H).

45 LC-MS m/z: 963,5 (M+H)+.

Ácido (2S)-5-[2-[2-[2-[2-[2-[4-formilfenil]metilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-5-oxo-2-(16-sulfohexadecanoilamino)pentanoico



60 La resina de 2-clorotritilo de malla 100-200 1,8 mmol/g (1, 8,40 g, 14,3 mmol) se dejó inflar en diclorometano seco (150 ml) durante 30 minutos. Una solución de Fmoc-Ado-OH (2,82 g, 9,50 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6,30 ml, 36,1 mmol) en diclorometano seco (~150 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 24 horas. La resina se filtró y trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (3,30 ml, 19,0 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 150 ml, 2 x 5 min). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante el tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-

5 dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml). La solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 4,80 g, 16,2 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 5,74 g, 16,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (4,47 ml, 25,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante el tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml). La solución del éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-Glu-OtBu, 6,87 g, 16,2 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 5,74 g, 16,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (4,47 ml, 25,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (150 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante el tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 150 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), 2-propanol (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml). Una 10 solución de ácido 16-((4-((terc-butoxicarbonil)amino)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonil)hexadecanoico (6,62 g, 12,4 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 4,39 g, 12,4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (4,47 ml, 25,7 mmol) en mezcla de N,N-dimetilformamida/diclorometano (1/1, 150 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 150 ml), metanol (5 x 150 ml) y diclorometano (10 x 150 ml). El producto se escindió de la resina mediante el tratamiento con 20 2,2,2-trifluoroetanol (150 ml) durante 24 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (3 x 150 ml). Las soluciones se combinaron, los solventes se evaporaron y el producto bruto (7,80 g) se purificó mediante cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 100:2 a diclorometano/metanol 100:10) para dar los compuestos intermedios como un sólido blanco.

25 Rendimiento: 4,00 g (42 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 8:1): 0,50.

30 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 7,79-7,65 (m, 1 H); 7,36-7,20 (m, 1 H); 6,86 (d, J=7,5 Hz, 1 H); 4,49-4,63 (m, 1 H); 4,44-4,29 (m, 1 H); 4,07-3,93 (m, 4 H); 3,90 (s, 2 H); 3,77-3,35 (m, 16 H); 3,25-3,02 (m, 4 H); 2,44-1,75 (m, 8 H); 1,72-1,38 (m, 22 H); 1,38-1,18 (m, 22 H); 1,00 (m, 6 H).

LC-MS m/z: 1012,3 (M+H)+.

35 El compuesto intermedio mencionado más arriba (3,77 g, 3,73 mmol), N,N-diisopropiletilamina (1,75 ml, 10,1 mmol), [1,2,3]triazolo[4,5-b]piridin-1-ol (HOAt, 0,51 g, 3,73 mmol), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC-HCl, 1,43 g, 7,46 mmol) se disolvieron en diclorometano (120 ml). Se añadió cloruro de 4-formil-bencil-amonio (5, 0,77 g, 4,48 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Despues de este tiempo la mezcla de reacción se evaporó, se disolvió en acetato de etilo (300 ml) y se lavó con solución acuosa 0,5 M de ácido clorhídrico (200 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con agua (200 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. El acetato de etilo se evaporó y la mezcla bruta se purificó mediante cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,060 mm; eluyente: diclorometano a diclorometano/metanol 100:5) para dar el aldehído protegido como un sólido blanco.

40 Rendimiento: 3,00 g (71 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 10:1): 0,70.

50 Espectro de RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, dH): 9,99 (s, 1 H); 7,85 (d, J=8,1 Hz, 2 H); 7,64-7,38 (m, 3 H); 7,14-6,97 (m, 1 H); 6,91-6,76 (m, 1 H); 6,54-6,43 (m, 1 H); 4,58 (d, J=6,2 Hz, 2 H); 4,47-4,32 (m, 1 H); 4,09 (s, 2 H); 3,88 (s, 2 H); 3,81-3,30 (m, 16 H); 3,22-3,02 (m, 4 H); 2,38-2,08 (m, 4 H); 1,96-1,71 (m, 5 H); 1,71-1,16 (m, 41 H); 0,99 (m, 6 H). LC-MS m/z: 1129,5 (M+H)+.

55 El aldehído protegido mencionado más arriba (3,00 g, 2,66 mmol) se agitó con mezcla de ácido trifluoroacético (15 ml) y agua (1 ml) durante 3 horas. Despues de este tiempo la mezcla se evaporó varias veces con diclorometano y tolueno a presión reducida. El residuo se vertió en mezcla de agua/acetonitrilo (1/1, 15 ml). El pH se ajustó a 8,0 con solución acuosa saturada de fosfato trisódico y la solución resultante se agitó durante 20 minutos a 50 °C. El pH se ajustó a 6,0 con solución acuosa saturada de hidrogenosulfato de potasio. El residuo se desalinizó mediante cromatografía en fase inversa (DeltaPak, C18, 15 mm 50 mm x 500 mm, acetonitriloagua 5-15 %/15 min, 5-60 55 %/180 min + TFA al 0,05 %). Los solventes se eliminaron mediante secado por congelación para dar el sustituyente como un polvo blanco.

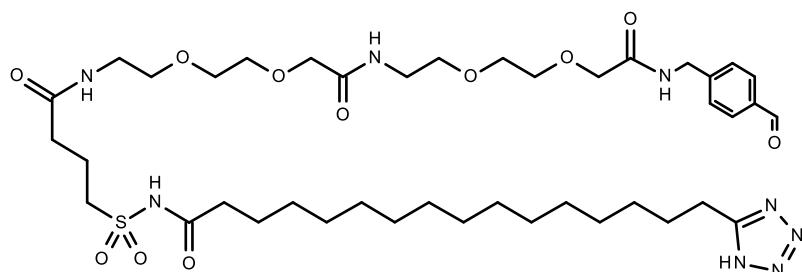
Rendimiento: 0,66 g (28 %).

Espectro de RMN 1H (300 MHz, D2O, dH): 9,81 (s, 1 H); 7,79 (d, J=7,7 Hz, 2 H); 7,41 (d, J=7,9 Hz, 2 H); 4,44 (s, 2 H); 4,32-4,19 (m, 1 H); 4,05 (s, 2 H); 3,90 (s, 2 H); 3,74-3,43 (m, 12 H); 3,38-3,18 (m, 4 H); 2,83-2,60 (m, 2 H); 2,37-1,76 (m, 6 H); 1,76-1,37 (m, 4 H); 1,34-0,91 (m, 22 H).

5 LC-MS m/z: 873,8 (M+H)+.

N-((1-(4-Formilfenil)-3,12,21-trioxo-5,8,14,17-tetraoxa-2,11,20-triazatetracosan-24-il)sulfonil)-16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanamida

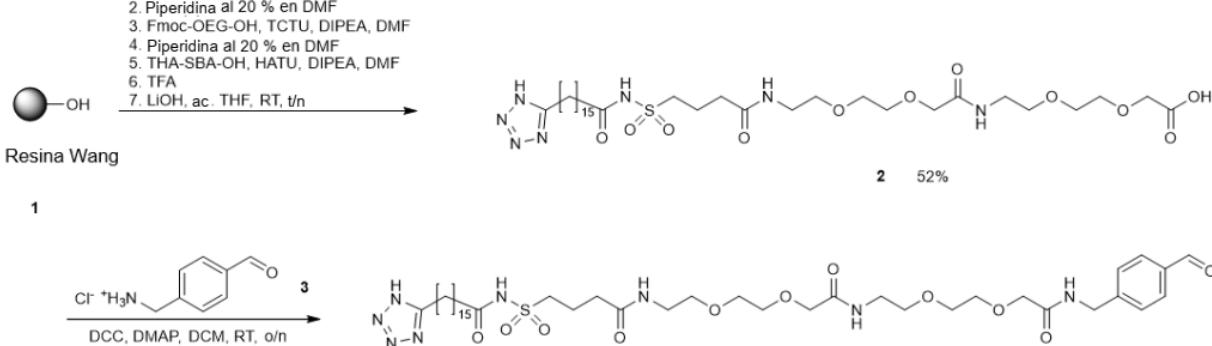
10



20

Esquema de reacción:

25



40

La resina Wang 0,68 mmol/g (20,5 g, 13,9 mmol) se dejó inflar en tetrahidrofurano (200 ml) durante 20 minutos. Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 16,1 g, 41,8 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,17 g, 1,39 mmol) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 6,47 ml, 41,8 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 18 horas. Despues la resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml). La resina se trató con una solución de anhídrido acético (13,2 ml, 139 mmol) y piridina (11,3 ml, 139 mmol) en N,N-dimetilformamida (180 ml). Despues la resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante el tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 180 ml). La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml). Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 10,8 g, 27,9 mmol), tetrafluoroborato de 3-óxido de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetilimino)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (TCTU, 9,91 g, 27,9 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (7,28 ml, 41,8 mmol) en N,N-dimetilformamida (180 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. Despues la resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml). El grupo Fmoc se retiró mediante el tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 180 ml). La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml). La solución de ácido 4-(N-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoil)sulfamoyl)butanoico (THA-SBA-OH, 8,91 g, 18,8 mmol), 1-((dimetilamino)(dimetilimino)metil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina 3-óxido hexafluorofosfato (HATU, 7,16 g, 18,8 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (5,71 ml, 32,8 mmol) en mezcla de N,N-dimetilformamida (90 ml) y diclorometano (90 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 18 horas.

65

La resina se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 180 ml), diclorometano (2 x 180 ml), 2-propanol (2 x 180 ml) y diclorometano (10 x 180 ml). El producto se escindió de la resina mediante el tratamiento con mezcla de ácido trifluoroacético (150 ml) y agua (7,5 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con diclorometano (2 x 150 ml). El solvente se retiró a presión reducida y el residuo se trató con éter dietílico (100 ml). A una solución del intermedio

(7,90 g, 10,3 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) se añadió monohidrato de hidróxido de litio (1.74 g, 41.4 mmol) en agua (100 ml). La solución se agitó durante 18 horas. La solución se acidificó mediante solución acuosa al 10 % de hidrogenosulfato de potasio hasta lograr pH=3, seguido mediante saturación con cloruro de sodio. La fase orgánica se retiró, la fase acuosa se extrajo mediante acetato de etilo (1 x 300 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se eliminó a presión reducida para dar el intermedio como un polvo blanco.

Rendimiento: 5,50 g (52 %).

10 Espectro de RMN 1H (300 MHz, AcOD-d4, dH): 4,22 (s, 2 H); 4,12 (s, 2 H); 3,83-3,61 (m, 12 H); 3,59-3,43 (m, 6 H); 3,02 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 2,49 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 2,41 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 2,22-2,09 (m, 2 H); 1,89-1,75 (m, 2 H); 1,74-1,60 (m, 2 H); 1,47-1,26 (m, 22 H).

15 Una solución del compuesto mencionado más arriba (2,90 g, 3,80 mmol), clorhidrato de 4-aminometilbenzaldehído (0,78 g, 4,56 mmol), N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC, 0,78 g, 3,80 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 1,02 g, 8,35 mmol) en diclorometano seco (100 ml) se agitó durante 18 horas. El precipitado se filtró y la solución se lavó con una solución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 10 % (2 x 100 ml). El solvente se retiró bajo presión reducida y el residuo se cristalizó a partir de tetrahidrofurano (30 ml). La purificación mediante cromatografía en columna rápida (Silicagel 60, 0,040-0,063 mm; eluyente: diclorometano/metanol, 20:1-5:1) dio el producto final como polvo amarillo pálido.

20 Rendimiento: 1,51 g (45 %).

25 Espectro RMN 1 H (300 MHz, AcOD-d4, dH): 9,96 (s, 1H); 7,91 (d, J=7,9 Hz, 2 H); 7,92 (d, J=7,9 Hz, 2 H); 4,63 (s, 2 H); 4,21 (s, 2 H); 4,08 (s, 2 H); 3,81-3,57 (m, 12 H); 3,54-3,41 (m, 6 H); 3,02 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 2,47 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 2,38 (t, J=7,4 Hz, 2 H); 2,19-2,07 (m, 2 H); 1,86-1,72 (m, 2 H); 1,70-1,57 (m, 2 H); 1,43-1,23 (m, 22 H).

Pureza por LC-MS: 100 %.

30 LC-MS Rt (Kinetex 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:50 a 100:0 + 0,1% FA): 3,58 min.

LC-MS m/z: 882,0 (M+H)+.

35 Se prepararon un total de 29 sustituyentes que se enumeran más abajo en la presente descripción, que especifica los elementos Z1-Z10 de cada uno de los sustituyentes individuales.

	Z1 (prolongador)	Z2	Z3	Z3-Z9	Z10
40	1. HOOC-(CH ₂) ₁₈ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
	2. HOOC-(CH ₂) ₁₈ -CO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₁₀)-CO-	-gGlu-	-ADO-	
45	3. HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
	4. HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-		-gGlu-	-ADO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -
50	5. HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-		-gGlu-		
	6. HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₁₀)-CO-	-gGlu-	-ADO-	
55	7. HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
	8. HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-		-gGlu-		
60	9. HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
	10. HOOC-(CH ₂) ₁₂ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
65	11. 4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-	-ADO-	
	12. 4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-	-ADO-	

13.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-		
14.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		2xgGlu-		
15.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-	-Gly-Gly-Gly-	
16.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		2xgGlu-	-ADO-ADO-	
17.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-	-TtdSuc-	
18.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-				
19.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-ADO-ADO-	
20.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₁₀)-CO-	-gGlu-	-ADO-ADO-	
21.	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
22.	3-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
23.	3-HO-Isoxazol-(CH ₂) ₁₂ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
24.	HOS(O) ₂ -(CH ₂) ₁₅ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -
25.	HOS(O) ₂ -(CH ₂) ₁₃ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
26.	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₅ -CO-	-NH-SO ₂ -(CH ₂) ₃ -CO -		-ADO-ADO-	-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -
27.	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₂ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
28.	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₅ -CO-		-gGlu-	-ADO-ADO-	
29.	MeS(O) ₂ NH(CO)NH-(CH ₂) ₁₂ -CO		-gGlu-	-ADO-ADO-	

Métodos para la detección y caracterización

Métodos de LCMS

LCMS01 (véase la Tabla 1)

Tabla 1: Sistema de LC: Acquity UPLC de Waters. Gradiente lineal: 5 % a 95 % de B.

Sistema	Sistema de LC: Acquity UPLC de Waters Columna: : Acquity UPLC de Waters BEH, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm Detector: :LCT Premier XE de Waters (Micromass)
Configuración del detector	Método de ionización: ES Intervalo de barrido: 500 – 2000 amu Modo de funcionamiento: Modo W positivo/negativo : modo positivo Tensión del Cono: 50 V Tiempo de barrido 1 Demora entre barridos: 0,0
Condiciones	Gradiente lineal: 5 % a 95 % de B Tiempo de ejecución del gradiente: 4,0 minutos Tiempo de ejecución total: 7,0 minutos Régimen de flujo: 0,4 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C
Eluyentes	Solvente A: Agua MQ al 99,90 %, ácido fórmico al 0,1 % Solvente B: acetonitrilo al 99,90 %, ácido fórmico al 0,1 % Solvente C: NA

5	5	Especificación y validación de resultados	La masa encontrada es la masa encontrada del compuesto La M/z encontrada es el ion molecular encontrado ((M+z)/z) del compuesto La masa calculada es el peso molecular del compuesto deseado La M/z calculada es el peso molecular (M+z)/z del compuesto deseado Pureza: Corriente iónica total (TIC) AUC del pico del analito, en porcentaje del AUC total, con exclusión del pico del solvente, según lo informado por el software del sistema. Identidad: La masa de cada pico de masa del analito se expresa como m/z de mayor a menor. El intervalo de barrido es el intervalo de barrido en el método usado. El método de detección es, por ejemplo, reflector lineal
10	10	LCMS027 (véase la Tabla 2)	

Tabla 2: UPLC serie Agilent 1290 infinity, LC/MSD TOF, 6 min, 5 % a 95 % de B, 100 – 3200 amu, C18

15	15	Sistema	Sistema: UPLC serie Agilent 1290 infinity Columna: Eclipse C18+2,1x 50 mm 1,8 u Detector: Agilent Technologies LC/MSD TOF 6230 (G6230A)
20	20	Configuración del detector	Método de ionización: Fuente Jet Stream de Agilent Intervalo de barrido: m/z mín. 100, m/z máx. 3200 modo de reflector lineal modo positivo
25	25	Condiciones	Gradiente lineal: 5 % a 95 % de B Tiempo de ejecución del gradiente: 6 minutos 0-4,5 min 5-95 % de B, 4,5-5 95% de B , 5-5,5 95-5 % de B 5,5-6 5% de B Régimen de flujo: fijado a 0,40 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C
30	30	Eluyentes	Solvente A: H ₂ O al 99,90 %, TFA al 0,02 % Solvente B: CH ₃ CN al 99,90 %, TFA al 0,02 % Solvente C: NA
35	35	Especificación y validación de resultados	La masa encontrada es ya sea m/z ((M+z)/z) del compuesto para los compuestos con m<4000 o masa (promedio) como el resultado de una deconvolución mediante el uso del programa informático Masshunter Workstation versión B.05.00 revisión 5.0.519.13 SP1 (Agilent). La masa calculada es el peso molecular promedio del compuesto deseado La m/z calculada es el peso molecular (M+z)/z del compuesto deseado

LCMS029 (véase la Tabla 3):

Tabla 3: Sistema Acquity UPLC de Waters, 6 min (3,5 min), 5-(15-35)-100-100-5 % de B

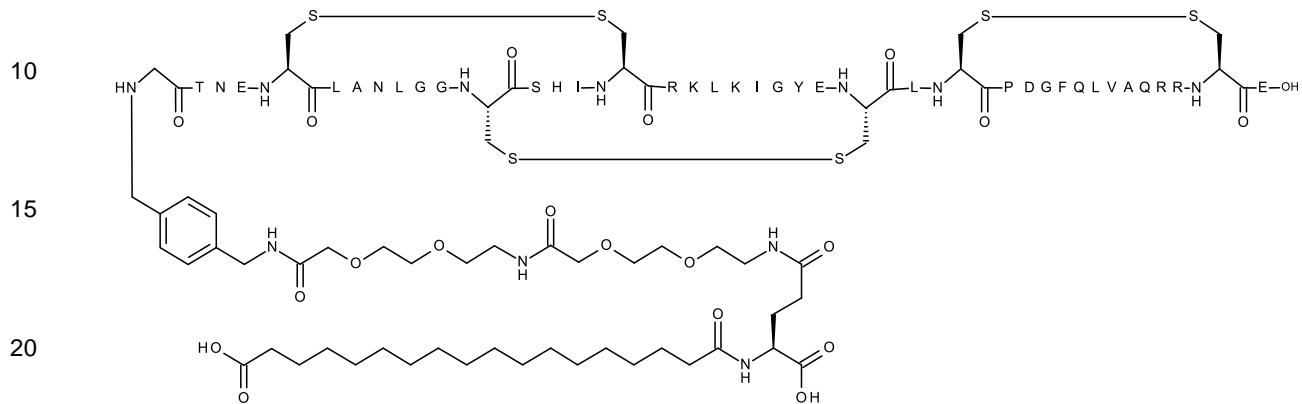
40	40	Sistema	Sistema: Sistema Acquity UPLC de Waters Columna: Columna ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 um, 2,1 mm x 50 mm Detectores: Detector Acquity TUV de Waters
45	45	Configuración del detector	214 nm o 254 nm
50	50	Condiciones	Gradiente por etapas: Ejecución de gradiente 0,0 - 0,5 min 5 - 15 % de B 0,5 - 4,0 min 15 - 35 % de B 4,0 - 4,5 min 35 - 100 % de B 4,5 - 5,0 min 100 - 100 % de B 5,0 - 5,5 min 100 - 5 % de B 5,5 - 6,0 min 5 - 5 % de B Tiempo de ejecución total: 6,0 minutos Régimen de flujo: fijado a 0,45 ml/min Temperatura de la columna: 40 °C
55	55	Eluyentes	Solvente A: Agua al 99,95 %, ácido trifluoroacético al 0,05 % Solvente B: Acetonitrilo al 99,95 %, ácido trifluoroacético al 0,05 %
60	60	Especificación y validación de resultados	La pureza se define como el AUC del pico en relación con el AUC total, con exclusión del pico del solvente (en porcentaje), según lo informado por el software del sistema para cada longitud de onda UV. Tiempo de retención entre 2,8 y 4,2 min, se requiere la separación del valor inicial del pico del analito. Valor de AU del pico entre 0,5 y 1,5. Los resultados cargados se basan en 214 nm

C. Ejemplos de compuestos

C.1. Preparación de los ejemplos de compuestos

Ejemplo 1

5 N{293}-[4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-
[Ala299,Leu301,Ile307,Arg309,Lys310]-LDL-R-(293-332)-péptido



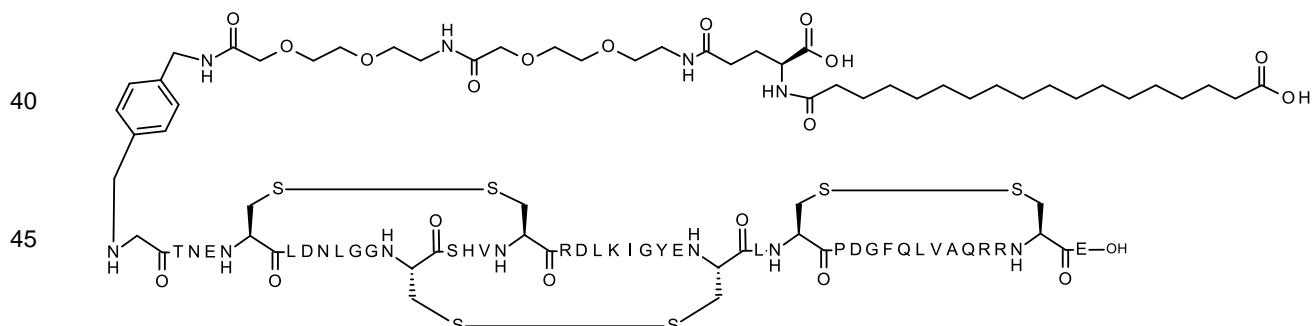
25 El péptido es la SEQ ID NO: 2.

25 Compuesto preparado mediante el método general A y C

30 LCMS029: m/3 encontrada = 1743,9; m/4 encontrada = 1308,1; m/5 encontrada = 1046,7; masa calc. = 5229,1;
masa encontrada = 5229,6

Ejemplo 2

35 N{293}-[4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-
[Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-332)-péptido



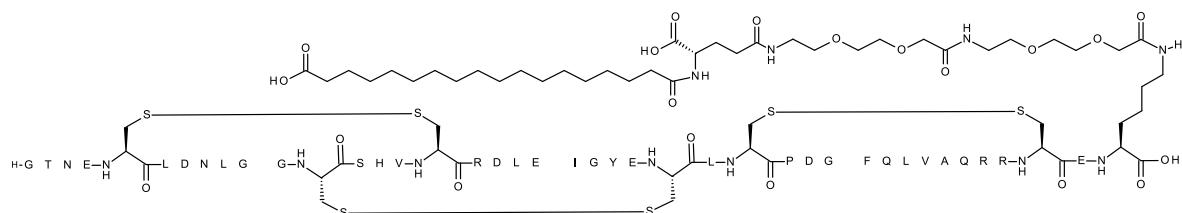
50 El péptido es la SEQ ID NO: 3.

50 Compuesto preparado mediante el método general A y C

55 LCMS029: m/3 encontrada = 1749,5; m/4 encontrada = 1312,4; m/5 encontrada = 1050,1; masa calc. = 5246,0;
masa encontrada = 5246,4

Ejemplo 3

60 N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

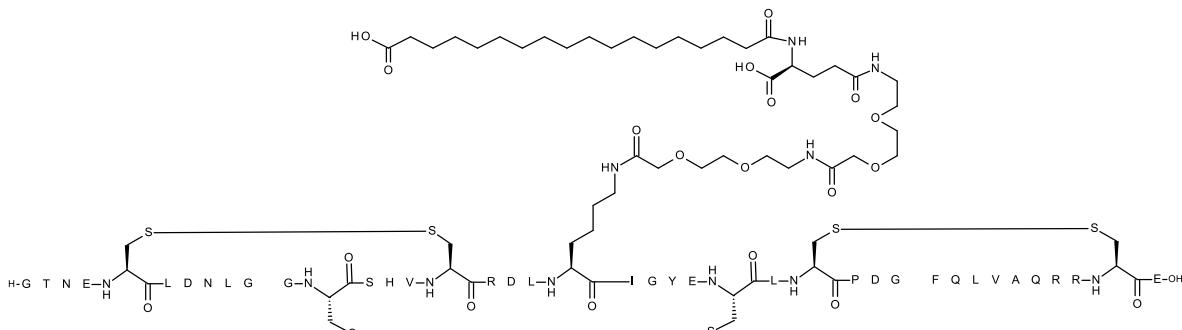


Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1314,6; m/5 encontrada = 1052,1; masa calc. = 5255,9

15 Ejemplo 4

20 N{épsilon-312}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-
332)-péptido

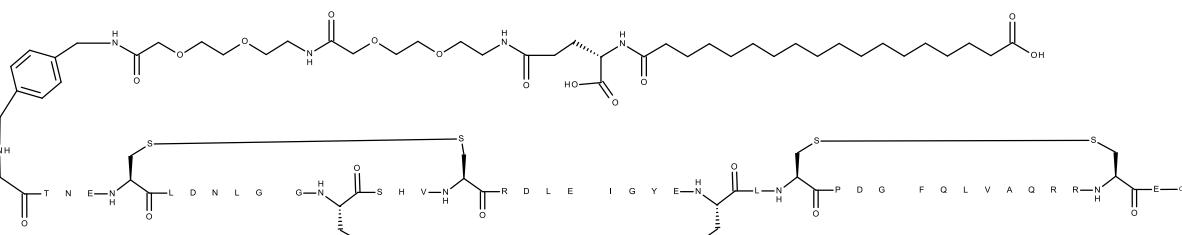


Compuesto preparado mediante el método general B

40 LCMS01: m/4 encontrada = 1282,3; m/5 encontrada = 1026,3; masa calc. = 5126,8

Ejemplo 5

45 N{293}-[4-[[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-
[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido

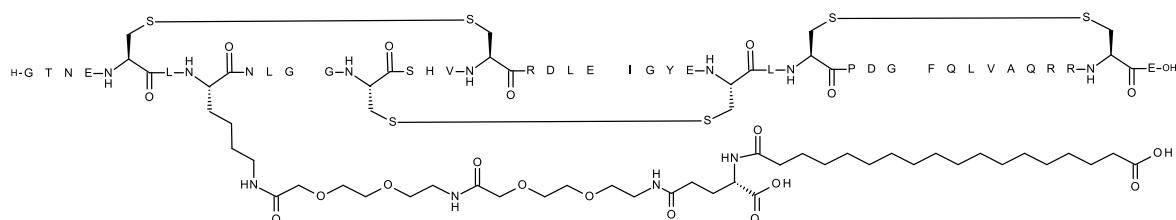


Compuesto preparado mediante el método general A y C

65 LCMS029: Masa calc. = 5246,92; masa encontrada = 5247,37

Ejemplo 6

5 N{épsilon-299}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
10 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
15 [Lys299,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



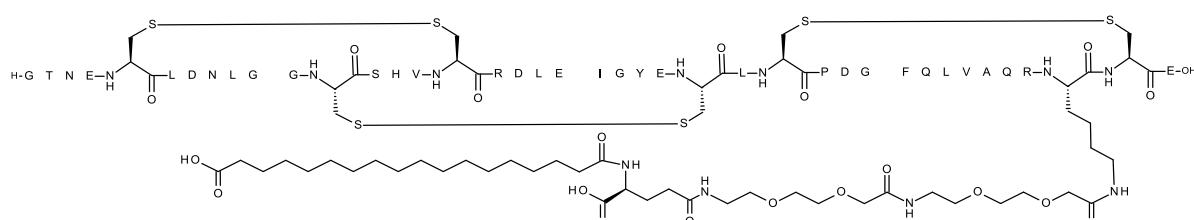
15 El péptido es la SEQ ID NO: 7.

15 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1714,2; m/4 encontrada = 1286,1; masa calc. = 5140,85

20 Ejemplo 7

25 N{épsilon-330}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
30 [Leu301,Arg309,Glu312,Lys330]-LDL-R-(293-332)-péptido



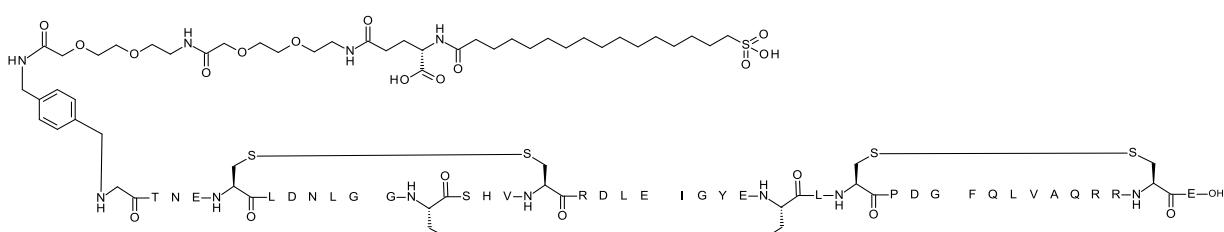
35 El péptido es la SEQ ID NO: 8.

35 Compuesto preparado mediante el método general B

40 LCMS01: m/3 encontrada = 1700,8; m/4 encontrada = 1275,8; m/5 encontrada = 1020,9, masa calc. 5099,7; masa encontrada = 5099,75

45 Ejemplo 8

45 N{293}-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-
sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-
50 [Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



55 23: El péptido es la SEQ ID NO: 6.

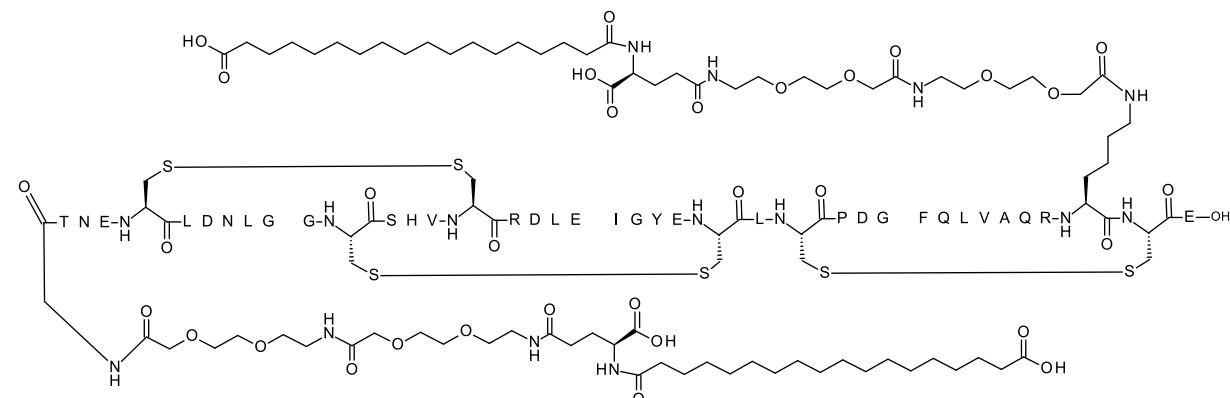
60 Compuesto preparado mediante el método general A y C

LCMS029: m/3 encontrada = 1757,1; m/4 encontrada = 1318,04; masa calc. = 5268,95; masa encontrada = 5269,39

65 Ejemplo 9

65 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-330}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[

[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys330]-LDL-R-(293-332)-péptido



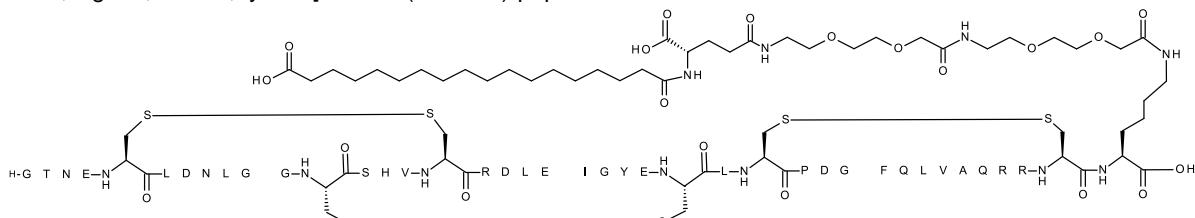
20 24: El péptido es la SEQ ID NO: 8.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/z encontrada = 1939,2; m/z encontrada = 1454,2; masa calc. = 5815,6; masa encontrada = 5816,1

Ejemplo 10

30 N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[2-[4(S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



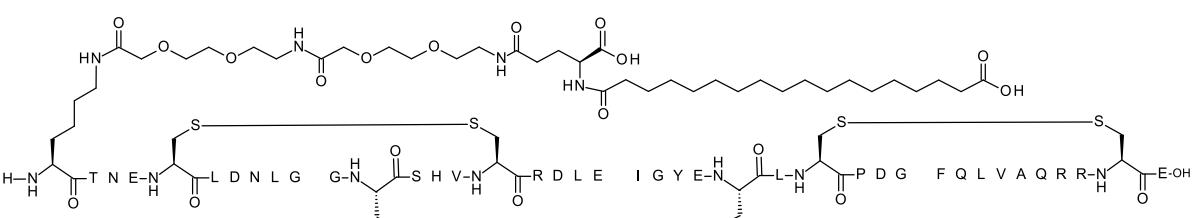
40 El péptido es la SEQ ID NO: 11

Compuesto preparado mediante el método general B

| CMS01: m/4 encontrada = 1282.6; m/5 encontrada = 1026.3; masa calc. = 5126.8

Ejemplo 11

50 N{épsilon-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetyl]amino]etoxi]etoxi]acetyl]-
[I]lys293,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 12.

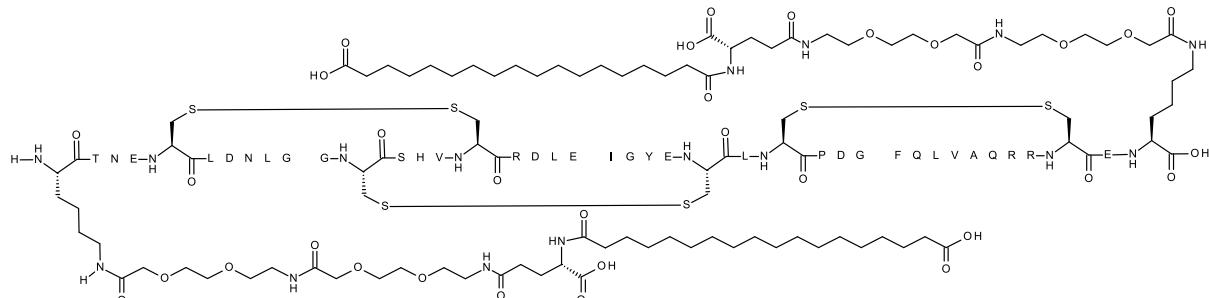
Compuesto preparado mediante el método general B

65 | CMS01: m/4 encontrada = 1300.6; m/5 encontrada = 1040.5; masa calc. = 5198.9

Ejemplo 12

5 N{alfa}{N{épsilon}-293}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-

10 [Lys293,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



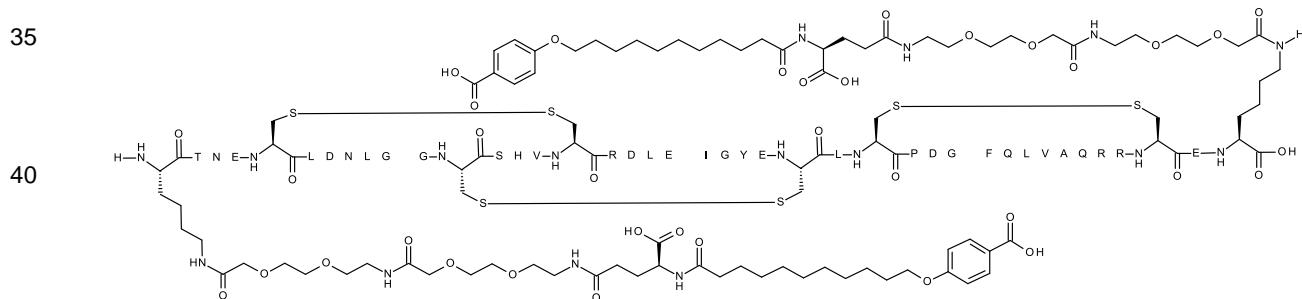
20 El péptido es la SEQ ID NO: 13.

Compuesto preparado mediante el método general B

25 LCMS029: m/2 encontrada = 3022,4; m/3 encontrada = 2015,3; m/4 encontrada = 1511,8; m/5 encontrada = 1209,6;
masa encontrada = 6043,6; masa calc. = 6042,9

Ejemplo 13

30 N{alfa}{N{épsilon}-293}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Lys293,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



45 El péptido es la SEQ ID NO: 13.

Compuesto preparado mediante el método general B

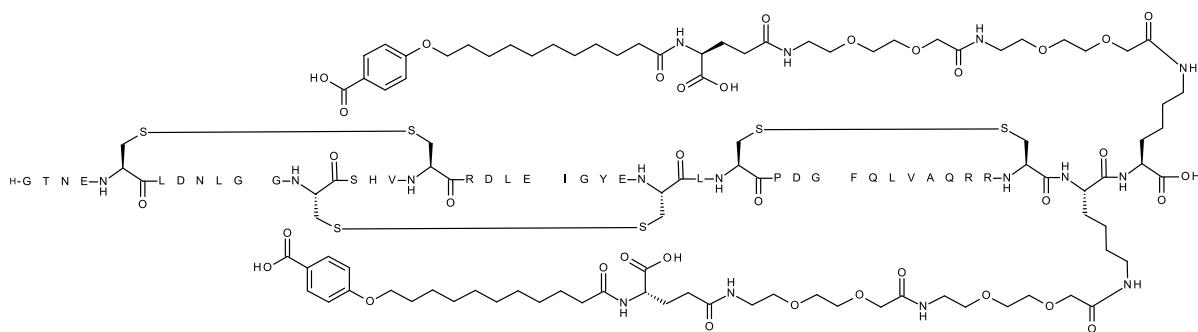
50 LCMS029: m/2 encontrada = 3030,4; m/3 encontrada = 2020,7; m/4 encontrada = 1515,7; m/5 encontrada = 1212,8;
masa encontrada = 6059,7; masa calc. = 6058,8

Ejemplo 14

55 N{alfa}{N{épsilon}-332}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

60

65



El péptido es la SEQ ID NO: 15.

15

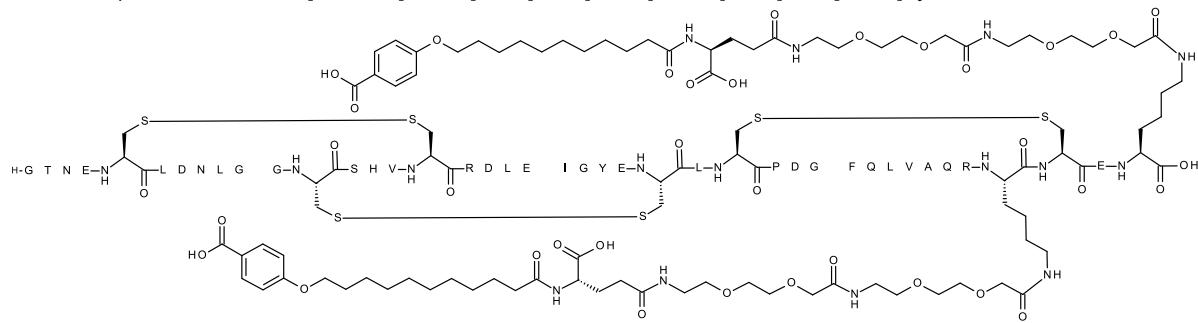
Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1497,4; m/5 encontrada = 1198,3; masa calc. = 5986,7

20

Ejemplo 15

N{alpha}{N{epsilon}-330}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys330]-LDL-R-(293-332)-peptidil-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

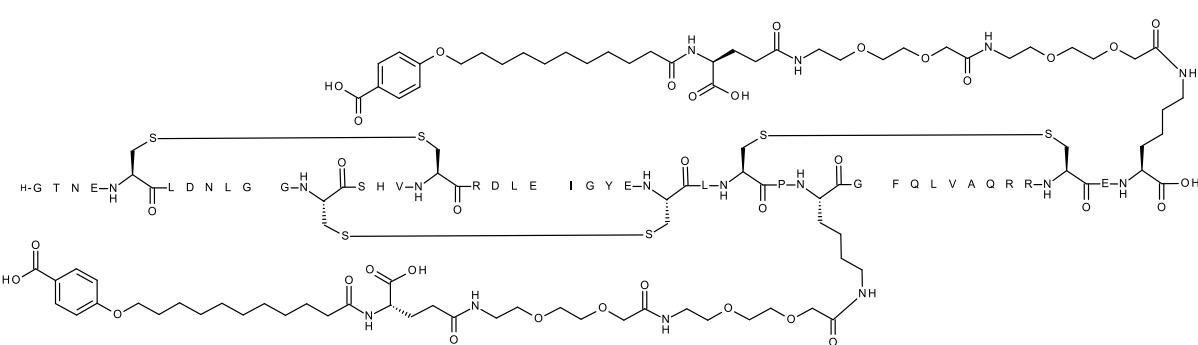


El péptido es la SEQ ID NO: 16.

40

Page 48

N{alpha}{N{épsilon-321}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil] vs



65

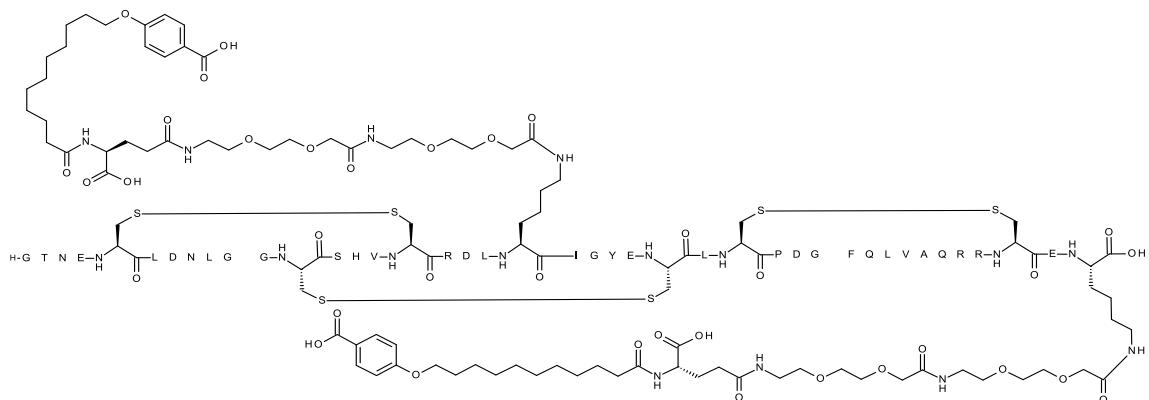
El péptido es la SEQ ID NO: 17

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1500,9; m/5 encontrada = 1201,2; masa calc. = 6000,8

5 Ejemplo 17

10 N{alpha}(N{epsilon}-312)-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[4-(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



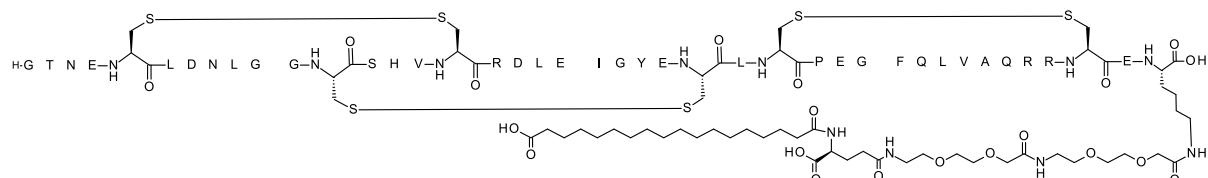
El péptido es la SEQ ID NO: 18.

Compuesto preparado mediante el método general B

30 | LCMS01: m/4 encontrada = 1498.2; m/5 encontrada = 1198.7; masa calc. = 5986.7

Ejemplo 18

35 N{alpha}{[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxy-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



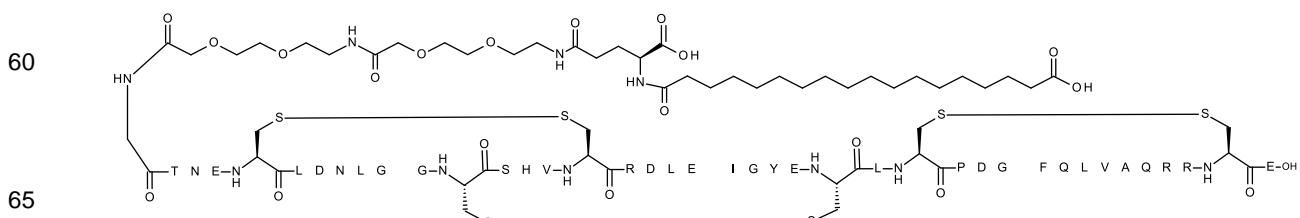
45 El péptido es la SEQ ID NO: 19

Compuesto preparado mediante el método general B

50 LCMS027: m/z encontrada = 2635,7; m/z encontrada = 1757,5; m/z encontrada = 1318,4; m/z encontrada = 1054,9; masa calc. = 5270,0; masa encontrada = 5270,5

Ejemplo 19

55 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-
(293-332)-péptido



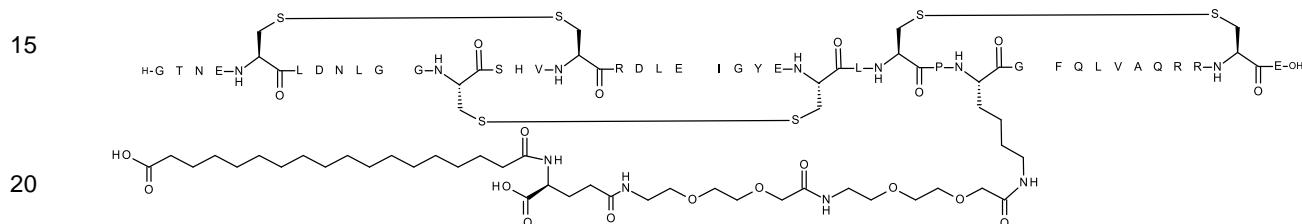
El péptido es la SEQ ID NO: 6.

Compuesto preparado mediante el método general A y D

5 LCMS01: m/1 encontrada = 5127,8; m/3 encontrada = 1710,0; m/4 encontrada = 1282,3; m/5 encontrada = 1026,5; masa calc. = 5127,8

Ejemplo 20

10 N{épsilon-321}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321]-LDL-R-(293-332)-péptido



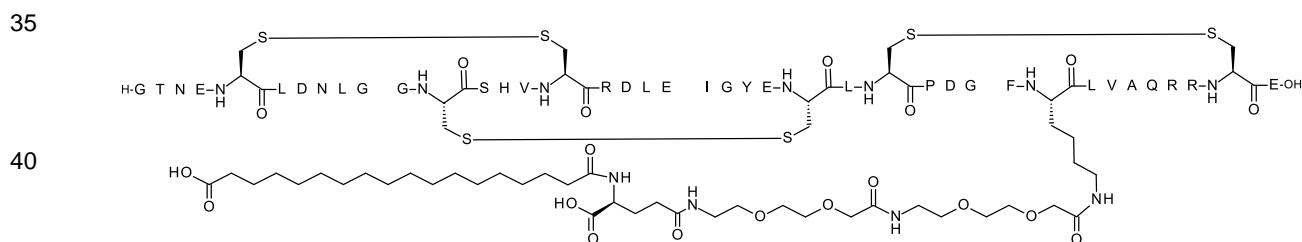
El péptido es la SEQ ID NO: 21.

25 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1286,1; m/5 encontrada = 1029,1; masa calc. = 5140,9

30 Ejemplo 21

N{épsilon-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-péptido



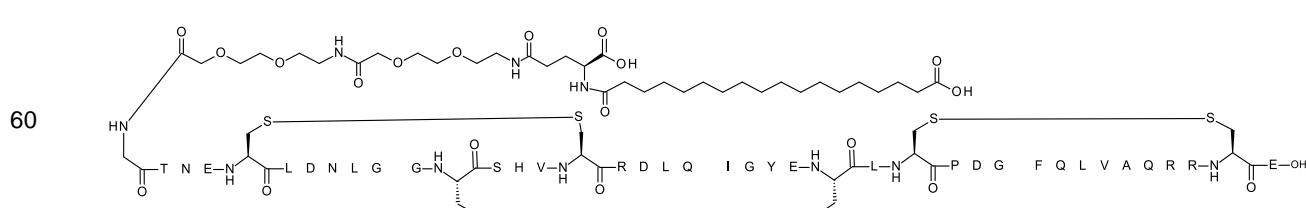
45 El péptido es la SEQ ID NO: 22.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1282,9; m/5 encontrada = 1026,5; masa calc. = 5127,8

50 Ejemplo 22

N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Gln312]-LDL-R-(293-332)-péptido



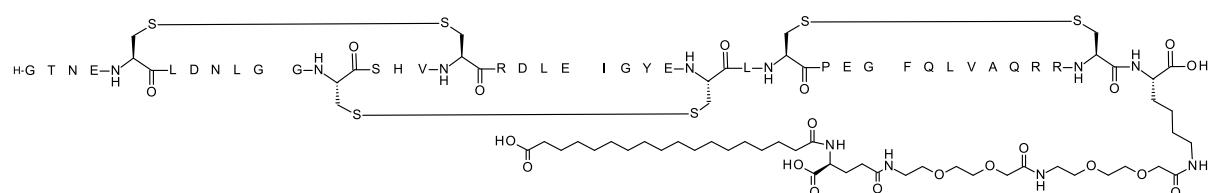
65 El péptido es la SEQ ID NO: 23.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/3 encontrada = 1709,8; m/4 encontrada = 1282,6; masa calc. = 5126,8; masa encontrada = 5127,3

5 Ejemplo 23

N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



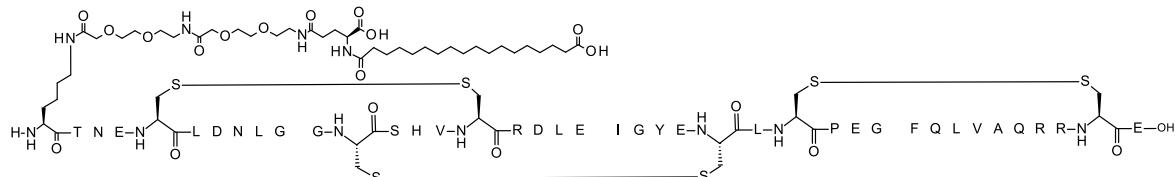
10 El péptido es la SEQ ID NO: 24.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/2 encontrada = 2571,2; m/3 encontrada = 1714,5; m/4 encontrada = 1286,1; m/z encontrada = 5141,4; masa calc. = 5140,9

25 Ejemplo 24

N{épsilon-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Lys293,Leu301,Arg309,Glu312,Glu321]-LDL-R-(293-332)-péptido



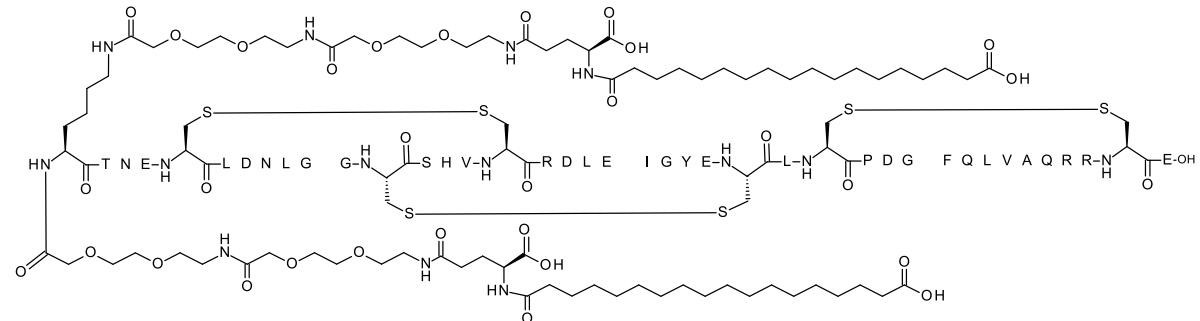
40 El péptido es la SEQ ID NO: 25.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/2 encontrada = 2607,2; m/3 encontrada = 1738,5; m/4 encontrada = 1304,1; masa encontrada = 5213,5; masa calc. = 5212,9

45 Ejemplo 25

N{alfa-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Lys293,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



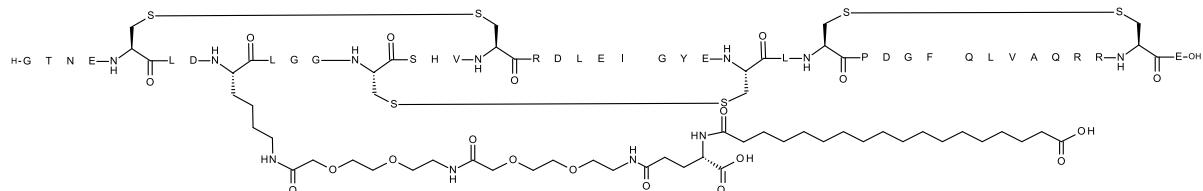
El péptido es la SEQ ID NO: 26.

Compuesto preparado mediante el método general B

5 LCMS029: m/4 encontrada = 1479,7; masa calc. = 5914,8 Da; masa encontrada = 5914,3

Ejemplo 26

10 N{épsilon-300}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Lys300,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido

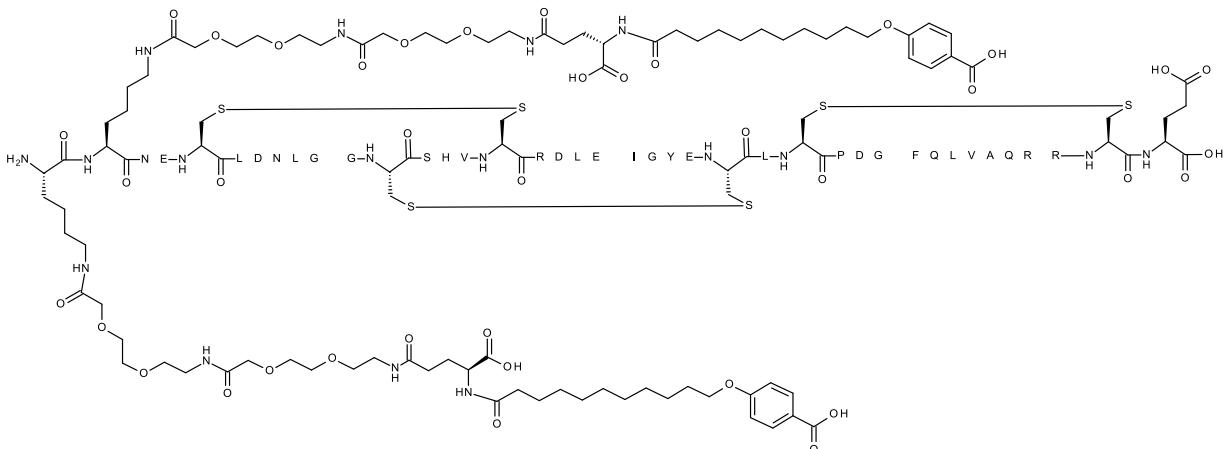


El péptido es la SEQ ID NO: 27.

Compuesto preparado mediante el método general B

25 LCMS01: m/4 encontrada = 1286,9; m/5 encontrada = 1029,7; masa calc. = 5141,8
Ejemplo 27

30 N{épsilon-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil], N{épsilon-294}-[2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Lys293,Lys294,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



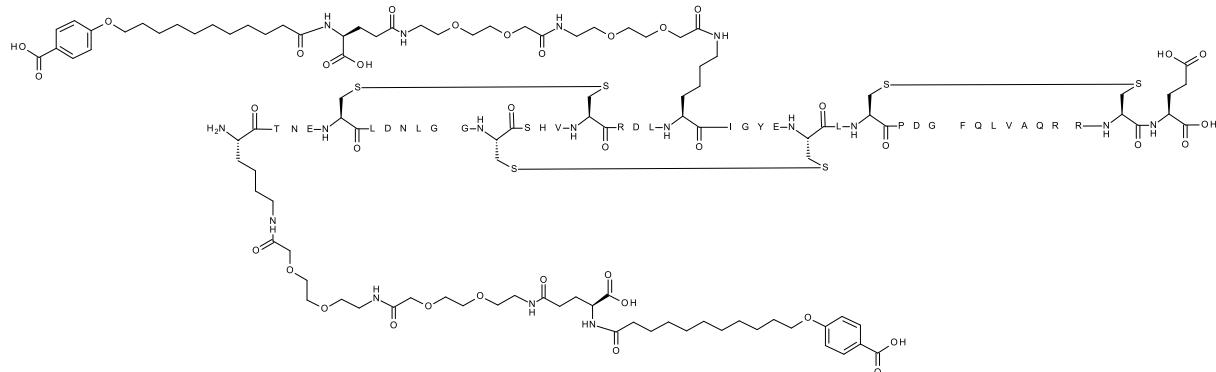
50 El péptido es la SEQ ID NO: 28.

Compuesto preparado mediante el método general B

55 LCMS01: m/1 encontrada = 5957,6; m/4 encontrada = 1490,4; m/5 encontrada = 1192,3; m/1 calc. = 5957,7

Ejemplo 28

60 N{épsilon-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil], N{épsilon-312}-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Lys293,Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-332)-péptido

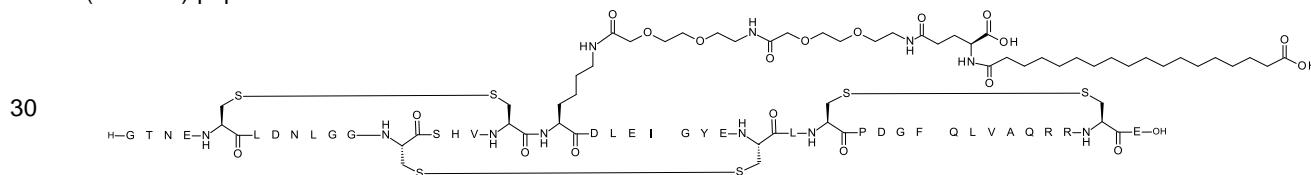


Compuesto preparado mediante el método general B

20 LCMS01: m/1 encontrada = 5929,4; m/4 encontrada = 1483,3; m/5 encontrada = 1186,8; m/1 calc. = 5929,7

Ejemplo 29

25 N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312]-LDL-R-
(293-332)-péptido



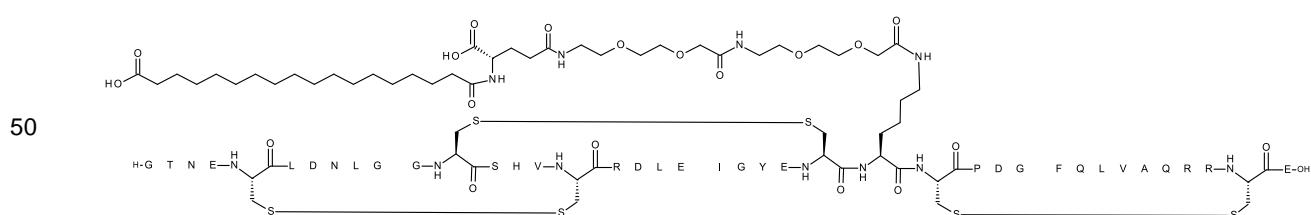
35 El péptido es la SEQ ID NO: 30.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1700,8; m/4 encontrada = 1275,8; m/5 encontrada = 1020,9; masa calc. = 5099,8 (1A)

40 Ejemplo 30

45 N{épsilon-318}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys318]-LDL-R-(293-332)-péptido



55 El péptido es la SEQ ID NO: 31.

LCMS01: m/4 encontrada = 1286,5; m/5 encontrada = 1029,5; masa calc. = 5142,8

60 Ejemplo 31

65 N{alfa}(N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

10 El péptido es la SEQ ID NO: 32.

Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS01: m/1 encontrada = 6002,8; m/4 encontrada = 1501,6; m/5 encontrada = 1201,5; m/1 calc. = 6002,7

Ejemplo 32

20 N{épsilon-326}-[2-[2-[2-[2-[2-[4(S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys326]-LDL-R-(293-332)-péptido

25 

30

El péptido es la SEQ ID NO: 33.

Compuesto preparado mediante el método general B

35 | CMS01; m/3 encontrada = 1719.8; m/4 encontrada = 1290.1; m/5 encontrada = 1032.3; masa calc. = 5156.8

Ejemplo 33

40 N{épsilon-325}-[2-[2-[2-[2-[2-[4(S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Ieu301,Arg309,Glu312,Lys325]-DI-R-(293-332)-péptido

45

50

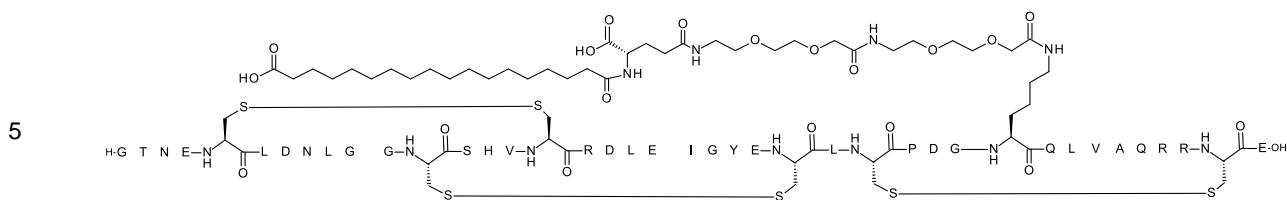
El péptido es la SEQ ID NO: 34.

Compuesto preparado mediante el método general B

55 | CMS01; m/3 encontrada = 1715.1; m/4 encontrada = 1286.6; m/5 encontrada = 1029.5; masa calc. = 5142.8

Ejemplo 34

60 N{épsilon-323}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Ieu301 Arg309 Glu312 Lys323]-DL-R-(293-332)-péptido

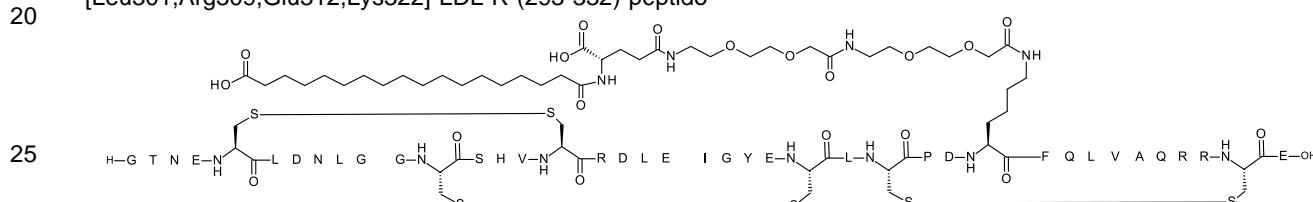


Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/1 encontrada = 5108,8; m/3 encontrada = 1703,8; m/4 encontrada = 1278,1; m/5 encontrada = 1022,5

15 Ejemplo 35

N{épsilon-322}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys322]-LDL-R-(293-332)-péptido



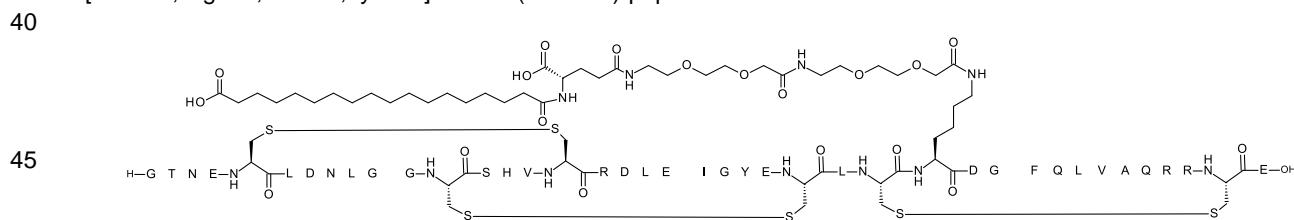
El péptido es la SEQ ID NO: 36.

30 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/1 encontrada = 5198,9; m/3 encontrada = 1733,8; m/4 encontrada = 1300,6; m/5 encontrada = 1040,7

35 Ejemplo 36

N{épsilon-320}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys320]-LDL-R-(293-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 37.

50 Compuesto preparado mediante el método general B

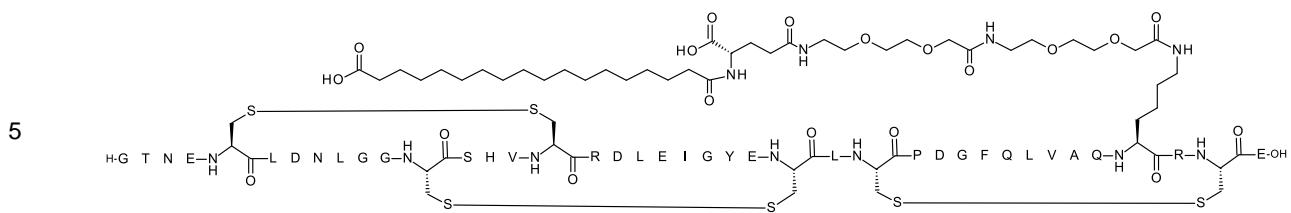
LCMS01: m/3 encontrada = 1720,4; m/4 encontrada = 1290,3; m/5 encontrada = 1032,5; masa calc. = 5158,8

55 Ejemplo 37

N{épsilon-329}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys329]-LDL-R-(293-332)-péptido

60

65



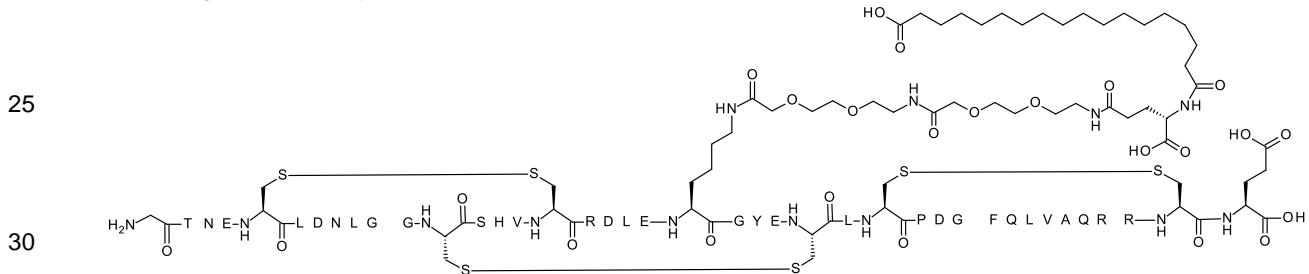
10 El péptido es la SEQ ID NO: 38.

Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS029: m/2 encontrada = 2550,7; m/3 encontrada = 1700,8; m/4 encontrada = 1275,9; masa calc. = 5099,8; m/1 encontrada = 5100,5

Ejemplo 38

20 N{épsilon-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil}-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-péptido



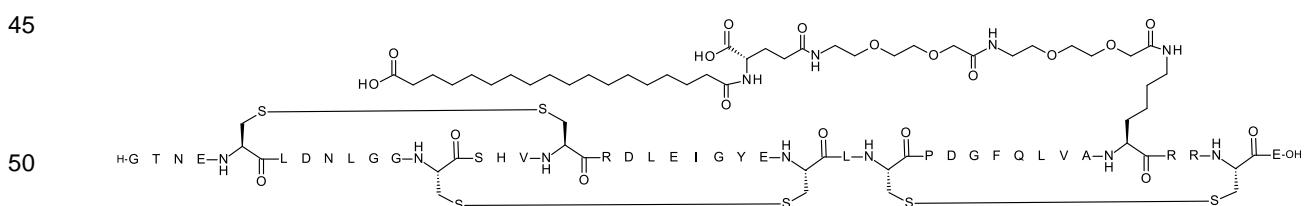
El péptido es la SEQ ID NO: 39.

35 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/1 encontrada = 5143,0; m/4 encontrada = 1286,0; m/5 encontrada = 1029,0; m/1 calc. = 5142,8

Ejemplo 39

40 N{épsilon-328}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil}-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys328]-LDL-R-(293-332)-péptido



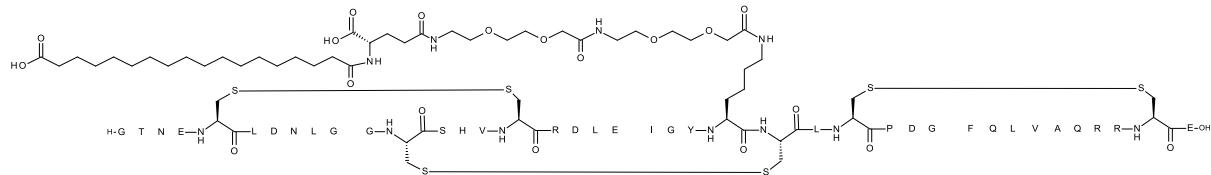
El péptido es la SEQ ID NO: 40.

55 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/2 encontrada = 2564,7; m/3 encontrada = 1710,2; m/4 encontrada = 1282,9; encontrada 5127,8; masa calc. = 5128,5

60 Ejemplo 40

65 N{épsilon-316}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil}-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys316]-LDL-R-(293-332)-péptido



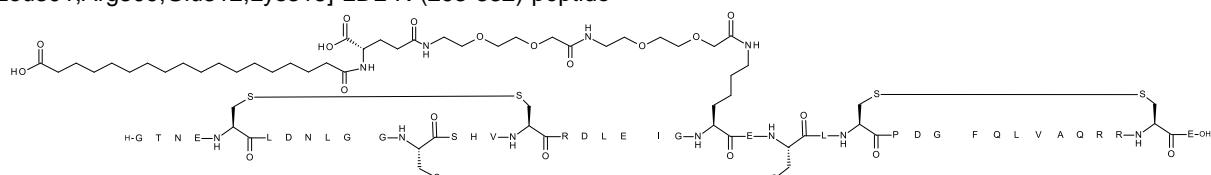
El péptido es la SEQ ID NO: 41.

10 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1709.7; m/4 encontrada = 1282.3; m/5 encontrada = 1026.1; masa calc. = 5126.8

15 Ejemplo 41

N{épsilon-315}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Ileu301,Arg309,Glu312,Lys315]-LDL-R-(293-332)-péptido



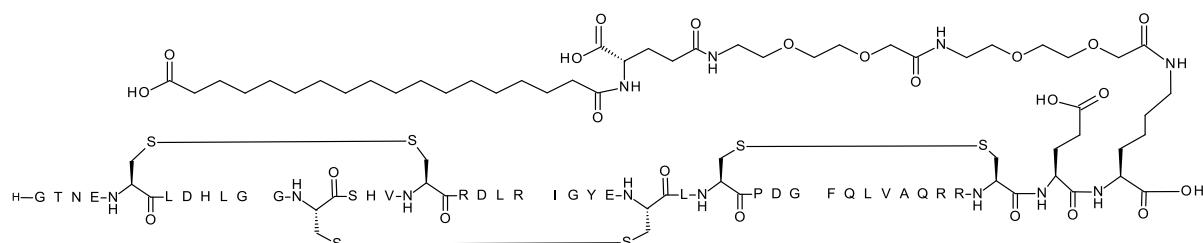
El péptido es la SEQ ID NO: 42.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1698,3; m/4 encontrada = 1273,8; m/5 encontrada = 1019,3; m/1 calc. = 5092,8

Ejemplo 42

35 N{alpha}{[His300,Leu301,Arg309,Arg312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxy-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



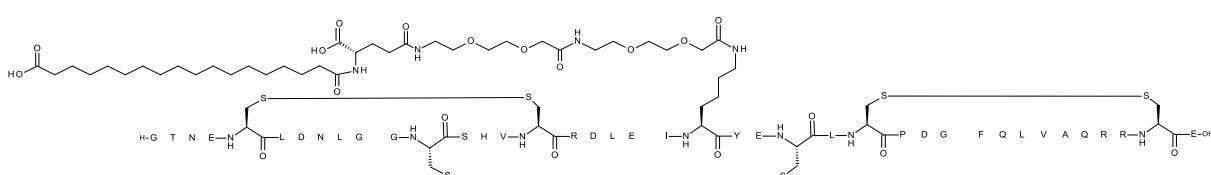
El péptido es la SEQ ID NO: 43.

50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/1 encontrada = 5306.3; m/3 encontrada = 1768.7; m/4 encontrada = 1327.1; m/5 encontrada = 1061.7

Ejemplo 43

N{épsilon-314}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-I [eu301, Arg309, Glu312, Lys314]-I DI -R-(293-332)-péptido



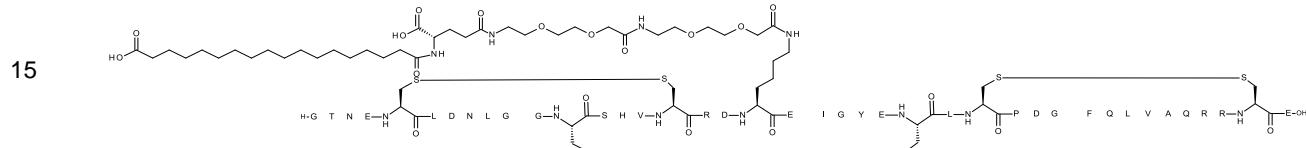
El péptido es la SEQ ID NO: 44.

Compuesto preparado mediante el método general B

5 LCMS01: m/4 encontrada = 1300,2; m/5 encontrada = 1040,2; masa calc. = 5198,9

Ejemplo 44

10 N{épsilon-311}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Lys311,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



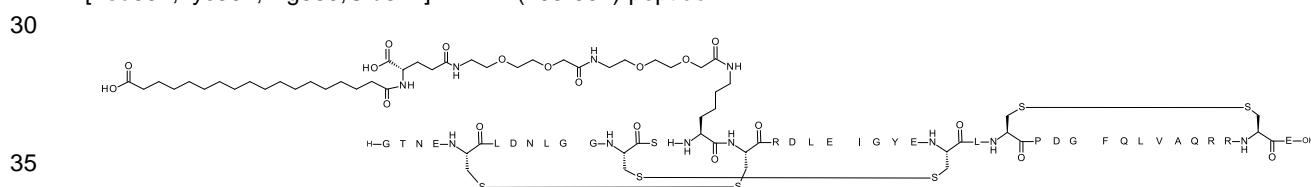
El péptido es la SEQ ID NO: 45.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1714,9; m/4 encontrada = 1286,2; m/5 encontrada = 1029,2; masa calc. = 5142,8

25 Ejemplo 45 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

N{épsilon-307}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Lys307,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



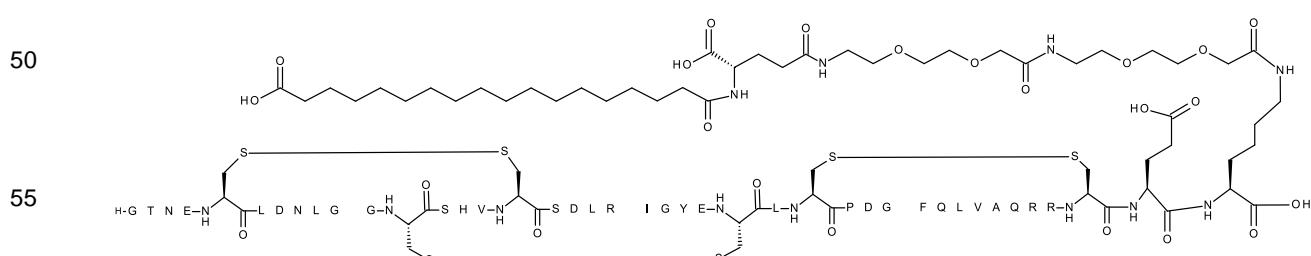
El péptido es la SEQ ID NO: 46.

40 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1919,8; m/4 encontrada = 1290,1; m/5 encontrada = 1032,3; masa calc. = 5156,8

Ejemplo 46

45 N{alfa}([Leu301,Ser309,Arg312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



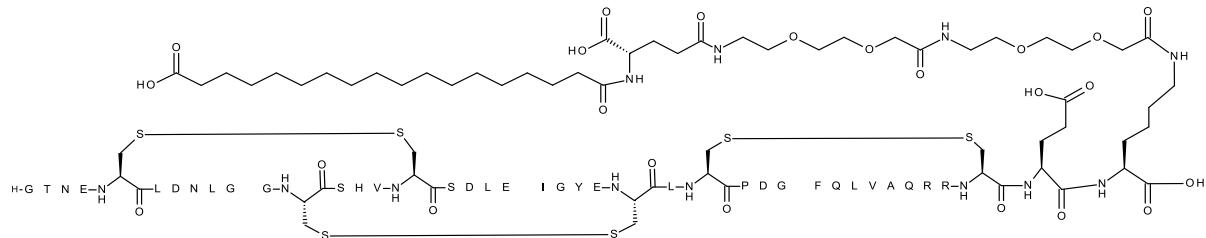
El péptido es la SEQ ID NO: 47.

60 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1738,8; m/4 encontrada = 1304,1; m/5 encontrada = 1043,5; masa encontrada = 5214,3

65 Ejemplo 47

N{alfa}{[Leu301,Ser309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



15 El péptido es la SEQ ID NO: 48.

15 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/1 encontrada = 5187,2; m/3 encontrada = 1729,7; m/4 encontrada = 1297,2; m/5 encontrada = 1038,4; m/1 calc. = 5186,8

20 Ejemplo 48

Ala299,Leu301,Ile307,Arg309,Lys310]-LDL-R-(293-332)-péptido



30 El péptido es la SEQ ID NO: 2.

Compuesto preparado mediante el método general A

35 LCMS01: m/3 encontrada = 1465,3; m/4 encontrada = 1099,3; m/5 encontrada = 879,6; calc. = 4391,0

Ejemplo 49

[Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 3.

Compuesto preparado mediante el método general A.

50 LCMS01: m/3 encontrada = 1470,3; m/4 encontrada = 1103,0; m/5 encontrada = 882,6; calc. = 4407,9

Ejemplo 50

55 [Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



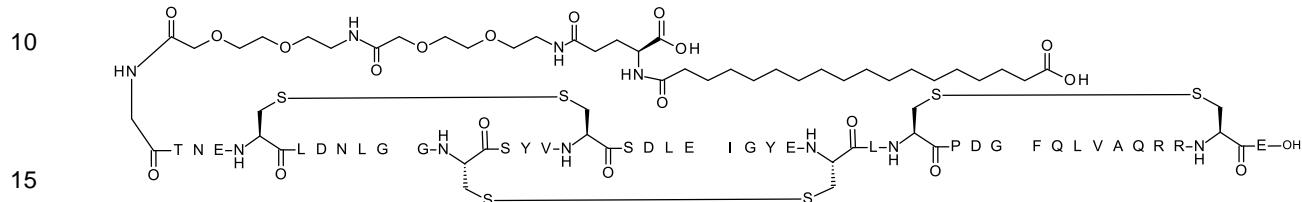
65 El péptido es la SEQ ID NO: 6.

Compuesto preparado mediante el método general A.

LCMS01: m/3 encontrada = 1471,3; m/4 encontrada = 1103,7; m/5 encontrada = 883,2; calc. = 4411,9

Ejemplo 51

- 5 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Tyr306,Ser309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



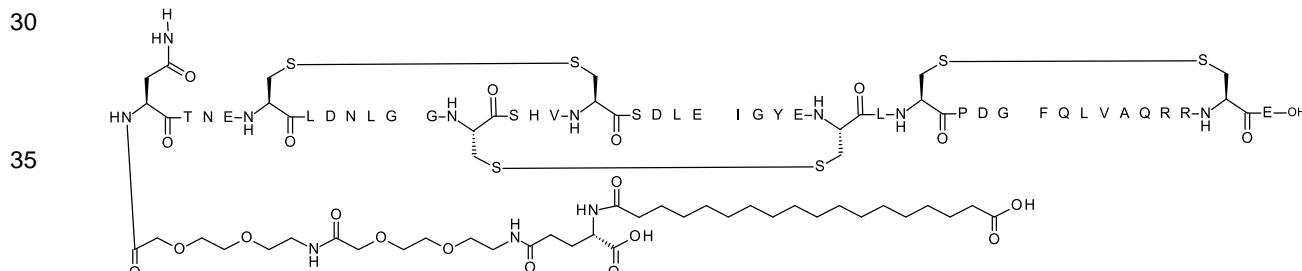
El péptido es la SEQ ID NO: 49.

- 20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/3 encontrada = 1695,8; masa calc. = 5085,1

Ejemplo 52

- 25 N{alfa-293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Asn293,Leu301,Ser309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



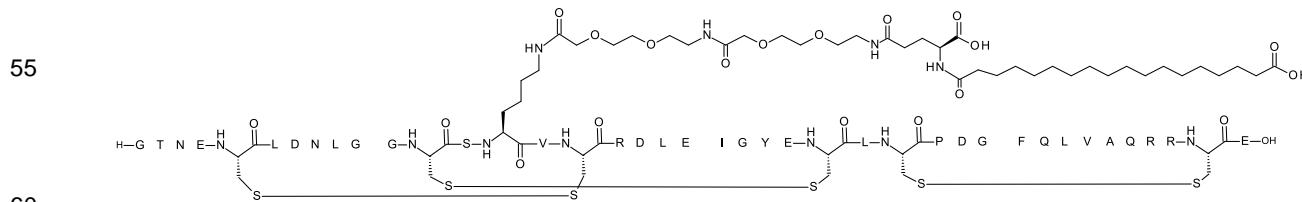
40 El péptido es la SEQ ID NO: 50.

LCMS29: m/3 encontrada = 1706,1, masa calc. = 5115,7

- 45 Compuesto preparado mediante el método general B

Ejemplo 53

- 50 N{épsilonlon-306}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Lys306,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



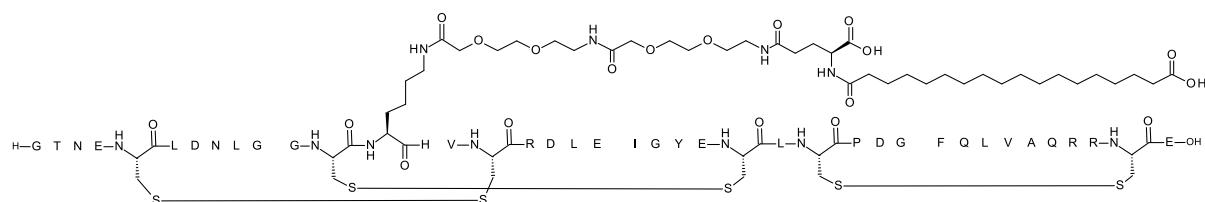
El péptido es la SEQ ID NO: 51.

Compuesto preparado mediante el método general B

- 65 LCMS01: m/3 encontrada = 1707,0; m/4 encontrada = 1280,3; m/5 encontrada = 1024,4; masa calc. = 5118,8

Ejemplo 54

5 N{épsilon-305}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys305,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



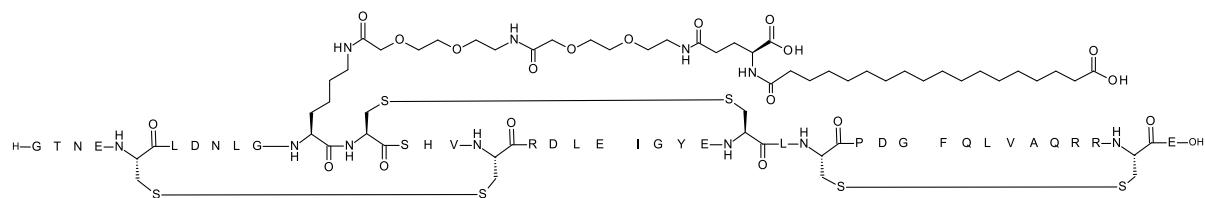
15 El péptido es la SEQ ID NO: 52.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1723,8; m/4 encontrada = 1292,8; m/5 encontrada = 1034,4; masa calc. = 5168,8

Ejemplo 55

20 N{épsilon-303}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys303,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



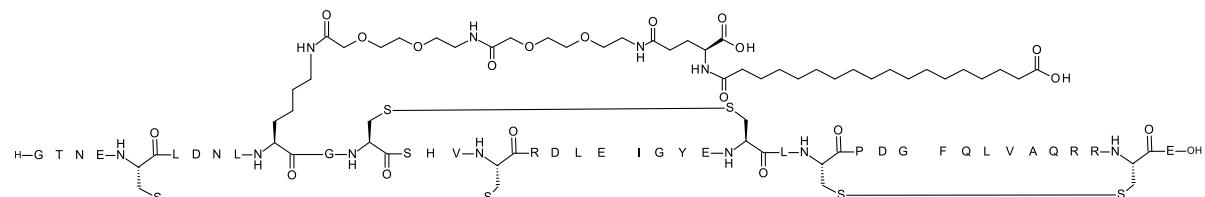
30 El péptido es la SEQ ID NO: 53.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1733,7; m/4 encontrada = 1300,3; m/5 encontrada = 1040,5; masa calc. = 5198,9

Ejemplo 56 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

40 N{épsilon-302}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys302,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



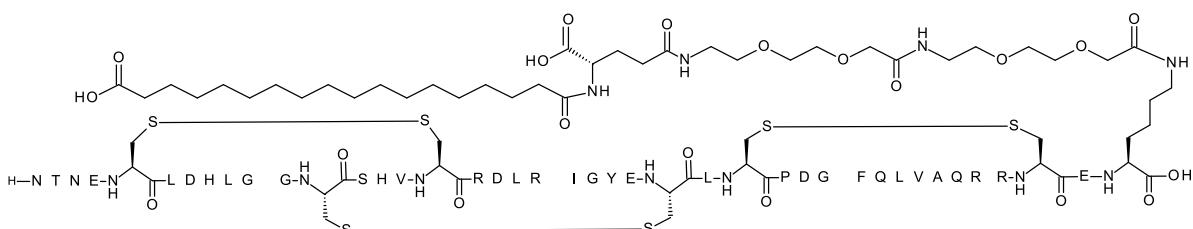
50 El péptido es la SEQ ID NO: 54.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1733,7; m/4 encontrada = 1300,3; m/5 encontrada = 1040,5; masa calc. = 5198,9

60 Ejemplo 57

65 N{alfa}{[Asn293,His300,Leu301,Arg309,Arg312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon-305}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys;

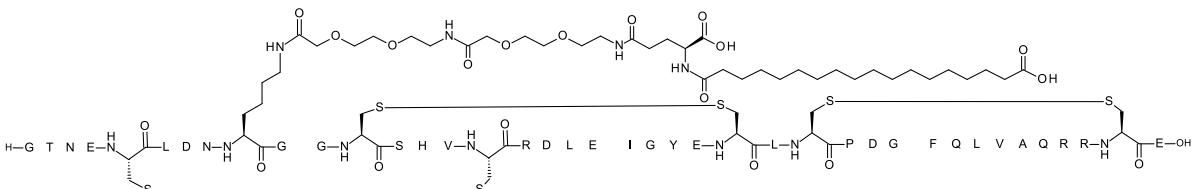


Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS01: m/4 encontrada = 1341,5; m/5 encontrada = 1073,3; masa calc. = 5363

Ejemplo 58 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

20 N{épsilon-301}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Lys301,Arg309,Glu312]-LDL-R-
(293-332)-péptido



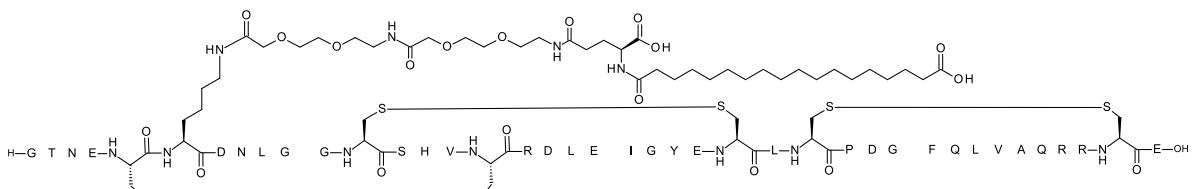
30 El péptido es la SEQ ID NO: 56.

Compuesto preparado mediante el método general B

35 LCMS01: m/3 encontrada = 1715,2; m/4 encontrada = 1286,6; m/5 encontrada = 1029,5; masa calc. = 5142,8

Ejemplo 59 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

40 N{épsilon-298}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Lys298,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



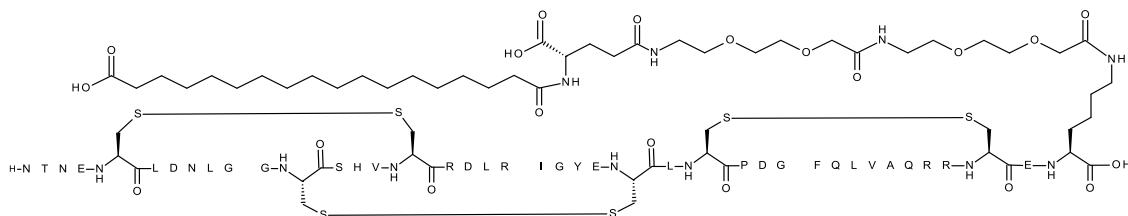
50 El péptido es la SEQ ID NO: 57.

Compuesto preparado mediante el método general B

55 LCMS01: m/3 encontrada = 1715,1; m/4 encontrada = 1286,3; m/5 encontrada = 1029,3; m/z calc. = 5142,8

Ejemplo 60

60 N{alfa}{[Asn293,Leu301,Arg309,Arg312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



10 El péptido es la SEQ ID NO: 58.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1780,7; m/4 encontrada = 1335,5; m/5 encontrada = 1068,4; masa calc. = 5340,1

15

Ejemplo 61

20

N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Ile307,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido

25

30

El péptido es la SEQ ID NO: 59.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1700,0; m/4 encontrada = 1275,1; m/5 encontrada = 1020,3; masa calc. = 5097,8

35

Ejemplo 62

40

N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Tyr306,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido;

45

50

El péptido es la SEQ ID NO: 60.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1704,3; m/4 encontrada = 1278,5; m/5 encontrada = 1030,4; m/z calc. = 5110,8

55

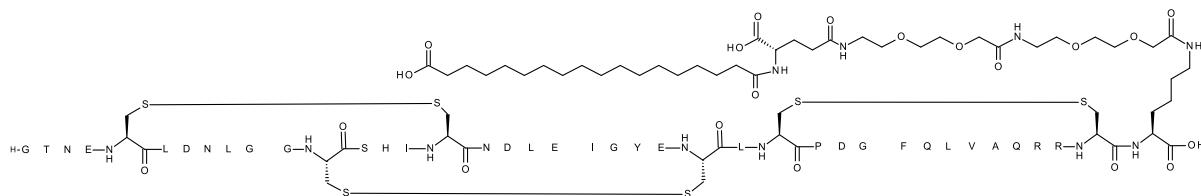
Ejemplo 63

60

N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Ile307,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido

65

5



12 El péptido es la SEQ ID NO: 61.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1700.3; m/4 encontrada = 1275.2; m/5 encontrada = masa calc. = 5098.8

15 Ejemplo 64

N{293}-[4-[[2-[2-[2-[2-[2-[4-(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-[His300,Leu301,Arg309]-LDL-R-(293-332)-péptido

[T₁3500,Lc3501,Lrg350] EDR (255-352) peptide

20

25

30

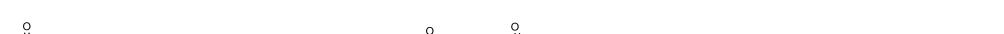
35

El péptido es la SEQ ID NO: 62.

35 Compuesto preparado mediante el método general A + C

N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Pro300 Leu301 Ile307 Arg309 Glu312]-Dl-R-(293-332)-n ptido

45 [Pro300,Leu301,Ile307,Arg309,Glut312]-LDL-R-(293-332)-peptido

50 

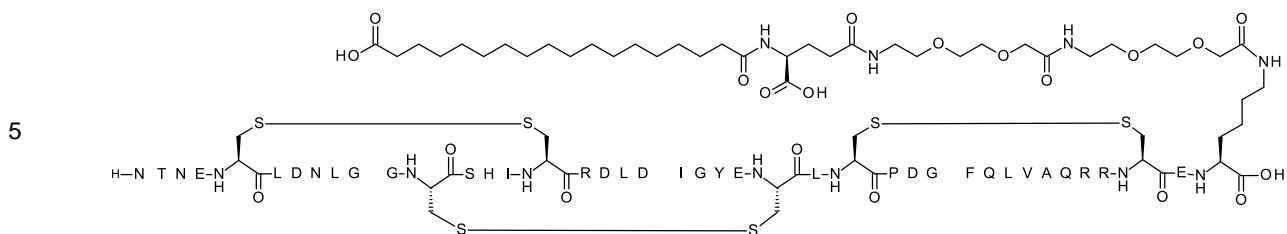
55 El péptido es la SEQ ID NO: 5.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/z encontrada = 1709,1; masa calc. = 5124,8

Ejemplo 66

N{alfa}([Asn293,Leu301,Ile307,Arg309,Asp312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[4(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

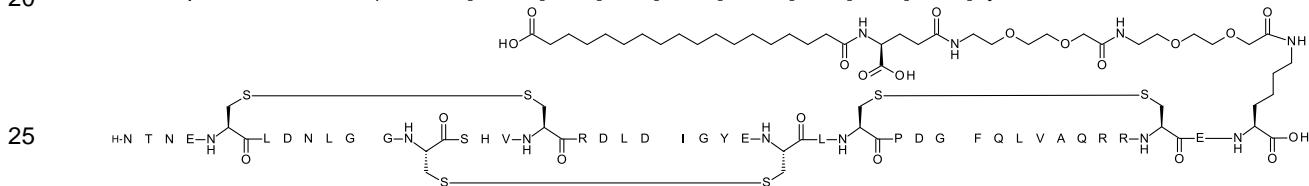


Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS029: m/4 encontrada = 1329,1; masa calc. = 5313,0

Ejemplo 67

20 N{alfa}{[Asn293,Leu301,Arg309,Asp312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}{[2-[2-[2-[2-[2-[4S]-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



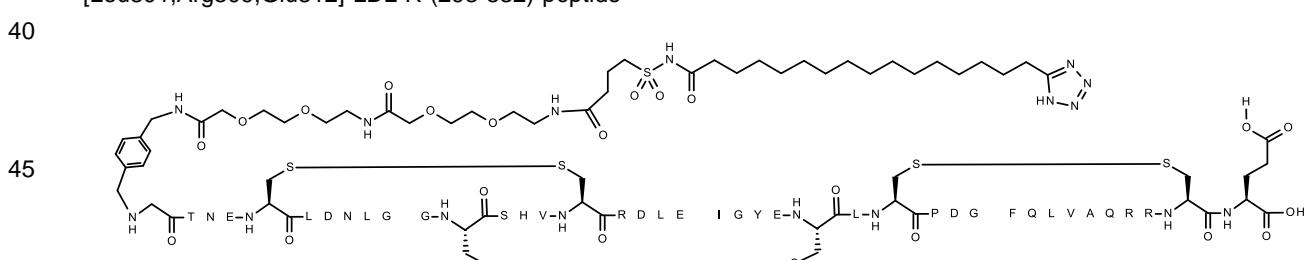
El péptido es la SEQ ID NO: 10.

30 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/4 encontrada = 1325,6; masa calc. = 5299,0

35 Ejemplo 68

40 N{293}-{4-[[2-[2-[2-[2-[2-[4-1H-tetrazol-5-
il]hexadecanoilsulfamoil]butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-
[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



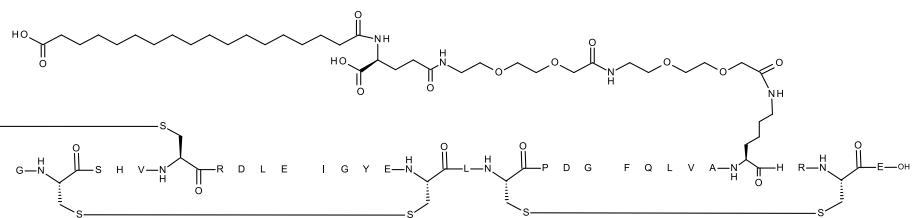
50 El péptido es la SEQ ID NO: 6.

Compuesto preparado mediante el método general C

55 LCMS029: m/4 encontrada = 1320,1; masa calc. = 5276,98

Ejemplo 69

60 N{épsilon-328}-{2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoilamino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys328,His329]-LDL-R-(293-332)-péptido



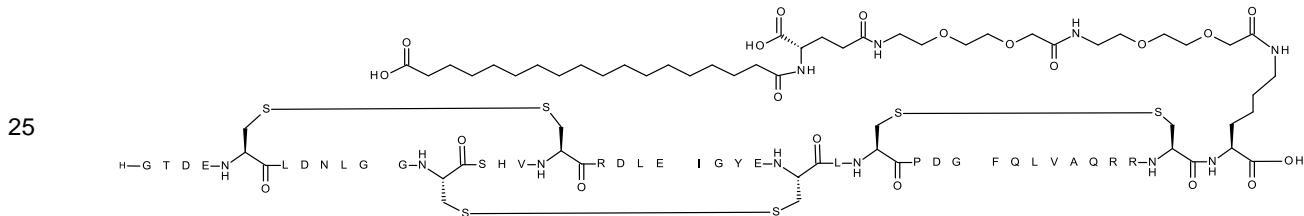
10 El péptido es la SEQ ID NO: 6.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/4 encontrada = 1278,09; masa calc. = 5108,8 Da

15 Ejemplo 70 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
20 [Asp295,Leu301,Arg309,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



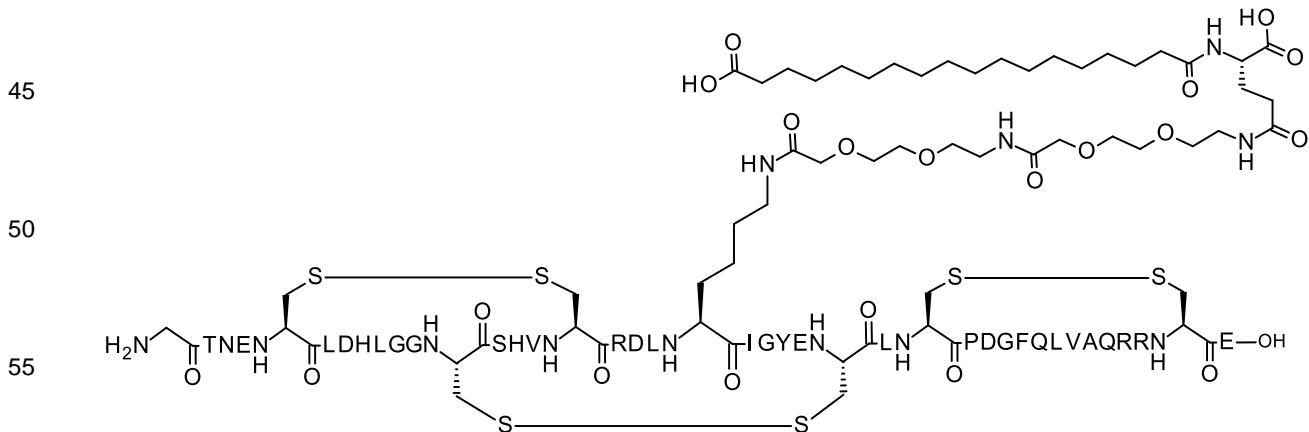
30 El péptido es la SEQ ID NO: 20.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/4 encontrada = 1282,84; masa calc. = 5127,8 Da

35 Ejemplo 71

N{épsilon-312}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309]-LDL-R-
40 (293-332)-péptido



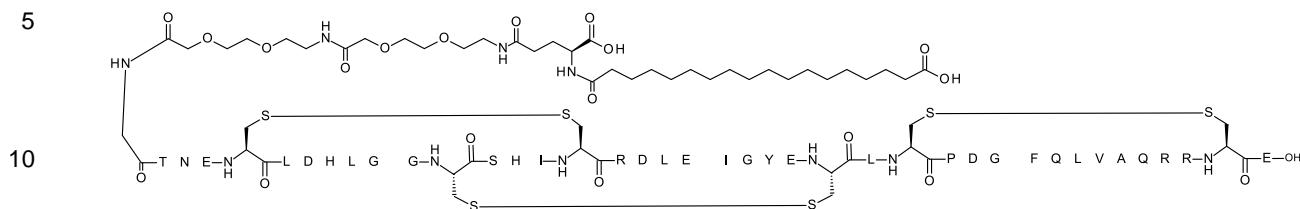
60 El péptido es la SEQ ID NO: 62.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1717,5 m/4 encontrada = 1288,2 m/5 encontrada = 1030,4 - masa calc. = 5149,9 -

65 Ejemplo 72

N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Ile307,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



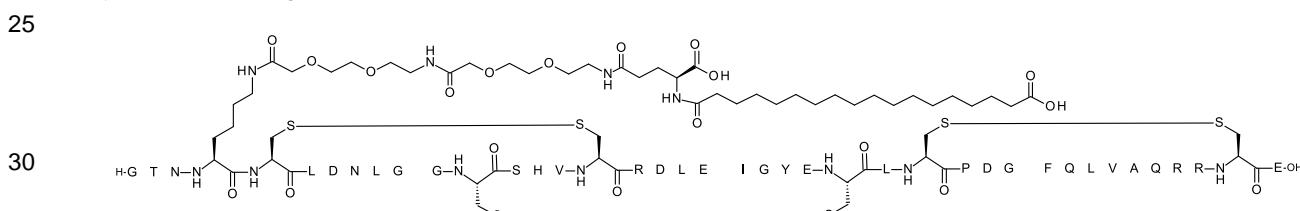
El péptido es la SEQ ID NO: 26.

15 Compuesto preparado mediante el método general B.

LCMS029: m/z encontrada = 1292.1; masa calc. = 5164.8 Da

ejemplo 73

N{épsilon-296}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys296,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



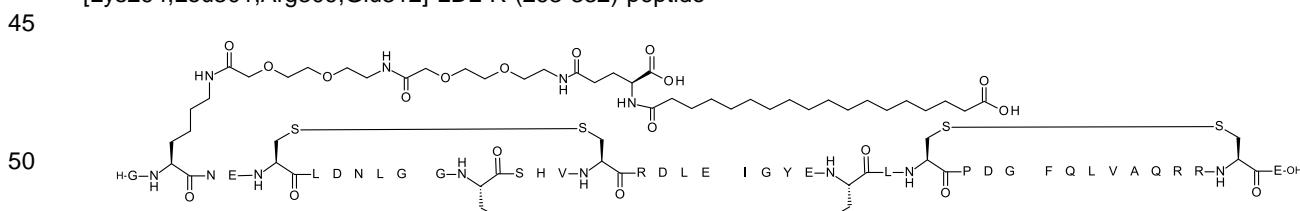
El péptido es la SEQ ID NO: 63.

35 [Comments](#) [About the Author](#) [Books](#) [Search](#) [Help](#)

LGM24 / September 1700-2000 / 4000-10000 / 5100-2000

10. Example 74

N{épsilon-294}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-I[lys294,Leu301,Arg309,Glu312]-DL-P-(293-332)-péptido

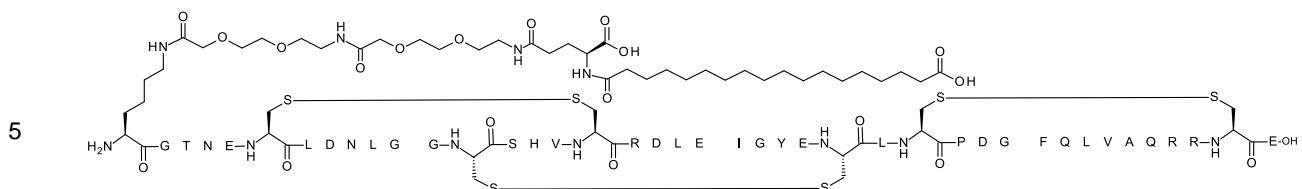


El péptido es la SEQ ID NO: 64

55

60 Figure 35

N{épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-B (203-232), nájdete



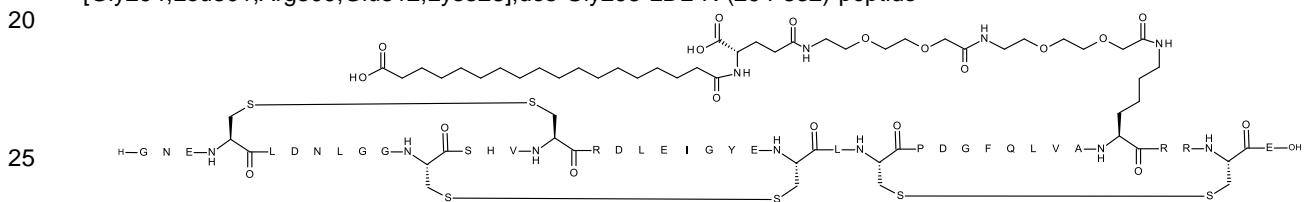
El péptido es la SEQ ID NO: 65.

10 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1752,9; m/4 encontrada = 1315,0; masa calc. = 5255,9

15 Ejemplo 76

20 N{épsilon-328}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Gly294,Leu301,Arg309,Glu312,Lys328],des-Gly293-LDL-R-(294-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 66.

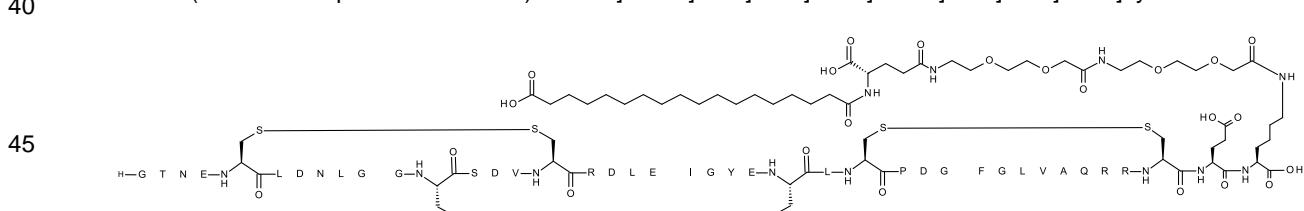
30 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1676,6 m/4 encontrada = 1257,7 m/5 encontrada = 1006)

35 -Masa calc. = 5026,7

Ejemplo 77

40 N{alfa}{[Leu301,Asp306,Arg309,Glu312,Gly324]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-
carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



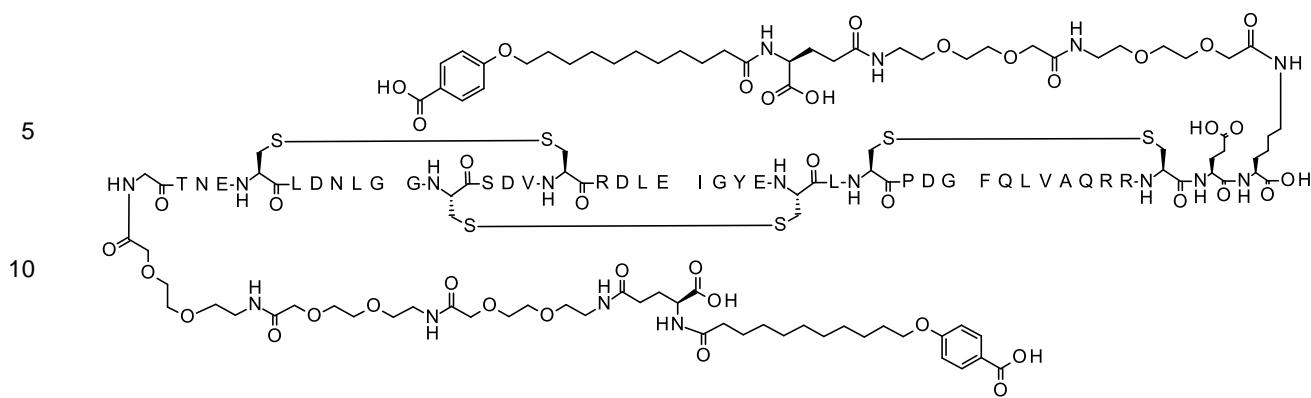
50 El péptido es la SEQ ID NO: 67.

50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/3 encontrada = 1721,8; masa calc. = 5162,8 Da

55 Ejemplo 78

60 N{alfa}{N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Asp306,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



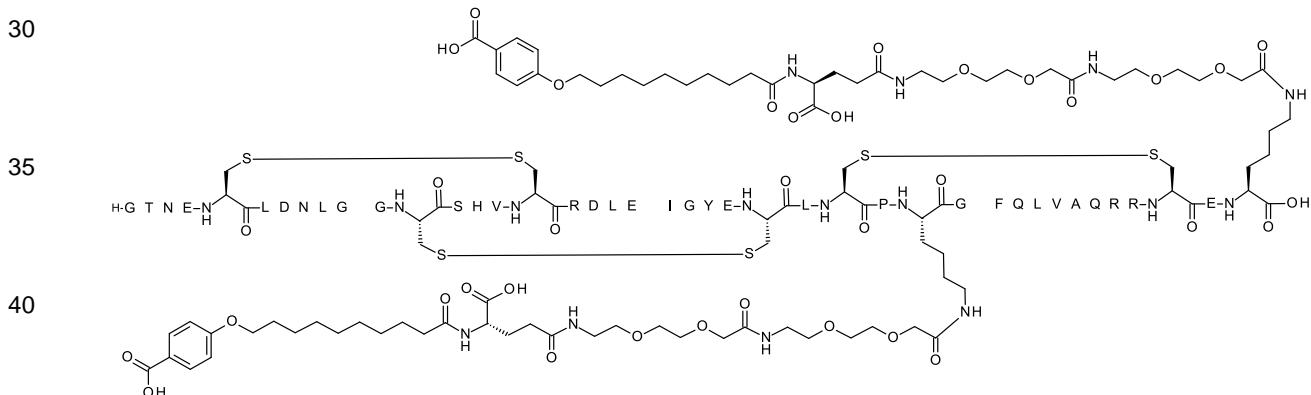
El péptido es la SEQ ID NO: 68.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS029: m/z encontrada = 1528.7; masa calc. = 6110.8 Da

Ejemplo 79

25 N{alpha}(N{épsilon}l-321)-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-
carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}l[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-
carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



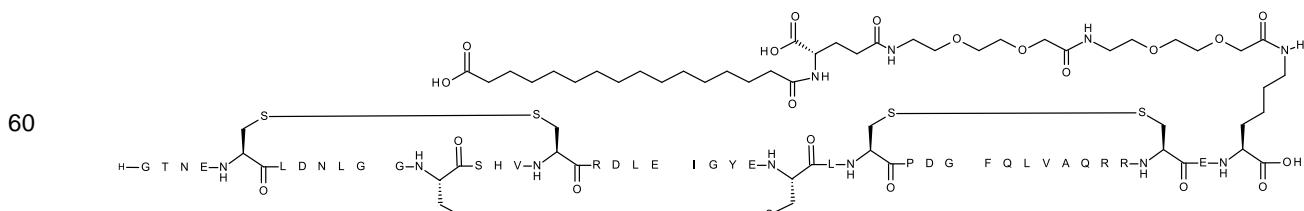
45 El péptido es la SEQ ID NO: 17.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1493,9; m/5 encontrada = 1195,5; masa calc. = 5972,7

Ejemplo 80

N{alpha}{[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N[epsilon]{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxy-4-(15-carboxypentadecanoilamino)butanoil]amino]letoxi]letoxi]acetil]amino]letoxi]letoxi]acetil]Lys



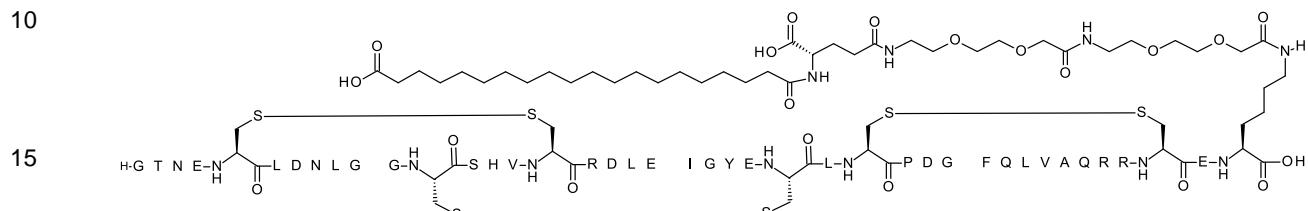
65 El péptido es la SEQ ID NO: 4.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1743,6; m/4 encontrada = 1307,9; m/5 encontrada = 1046,4 masa calc. = 5227,9

5 Ejemplo 81

N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



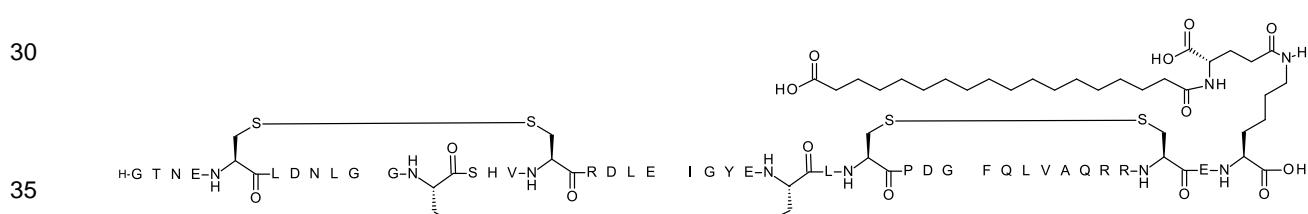
20 El péptido es la SEQ ID NO: 4.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1762,3; m/4 encontrada = 1321,7; m/5 encontrada = 1057,8; masa calc. = 5284,0

Ejemplo 82

25 N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]Lys



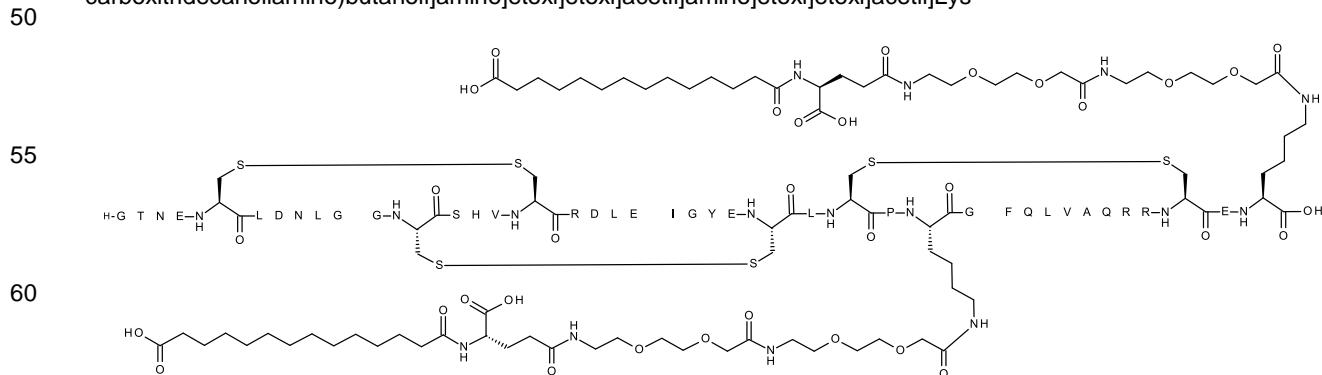
40 El péptido es la SEQ ID NO: 4.

40 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1656,2; m/4 encontrada = 1242,4; m/5 encontrada = 994,0; masa calc. = 4965,6

45 Ejemplo 83

45 N{alfa}{(N{épsilon}-321)-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



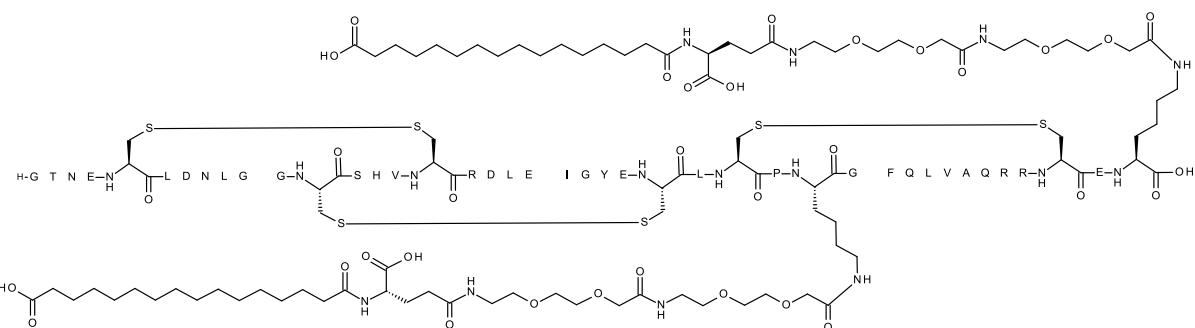
60 El péptido es la SEQ ID NO: 17.

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/3 encontrada = 1958,5; m/4 encontrada = 1468,9; m/5 encontrada = 1175,3; masa calc. = 5872,7

5 Ejemplo 84

N{alfa}{N{épsilon}-321}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

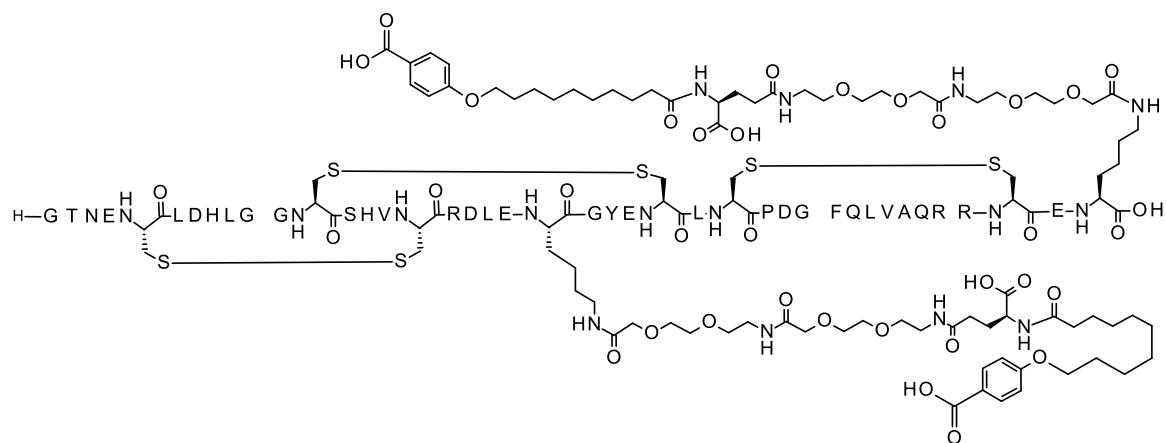


Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1483,1; m/5 encontrada = 1186,6; masa calc. = 5928,8

30 Ejemplo 85

N{alfa}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-
carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-
(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



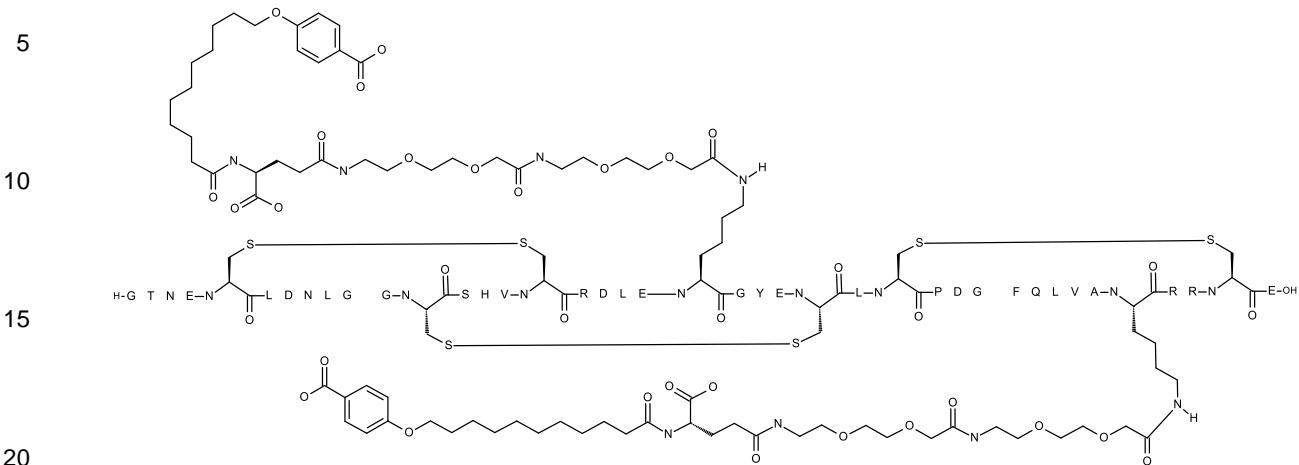
Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1500,1 m/5 encontrada = 1200,3 m/z encontrada = 1000. masa calc. = 5997,7

60 Ejemplo 86

N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon}-328}-[2-[2-[2-
[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]

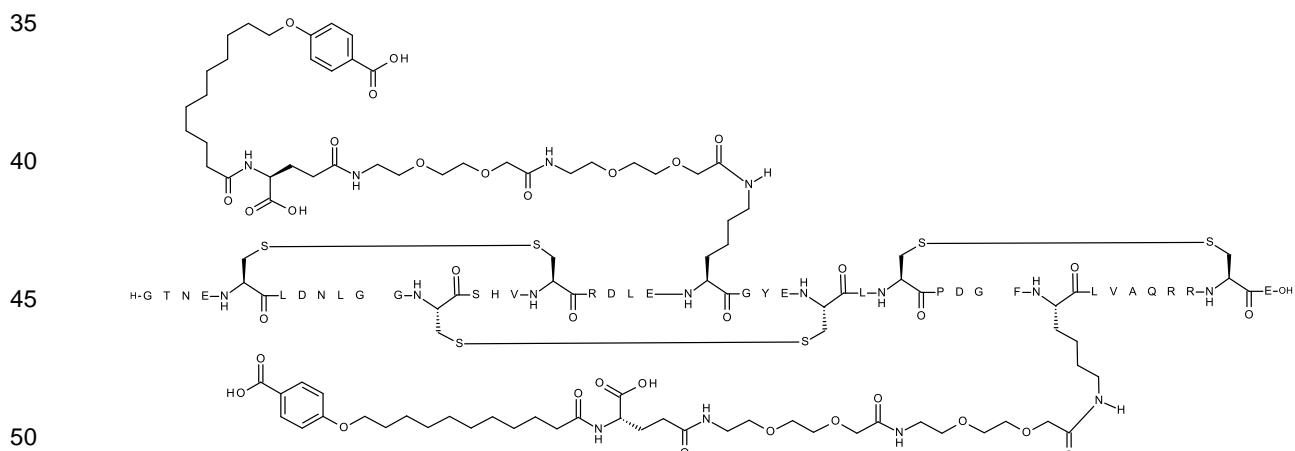
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys328]-LDL-R-(293-332)-péptido



Compuesto preparado mediante el método general B
LCMS01: m/4 encontrada = 1469,3; m/5 encontrada = 1175,8; masa calc. = 5874,6

Ejemplo 87

30 N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys324]-LDL-R-(293-332)-péptido

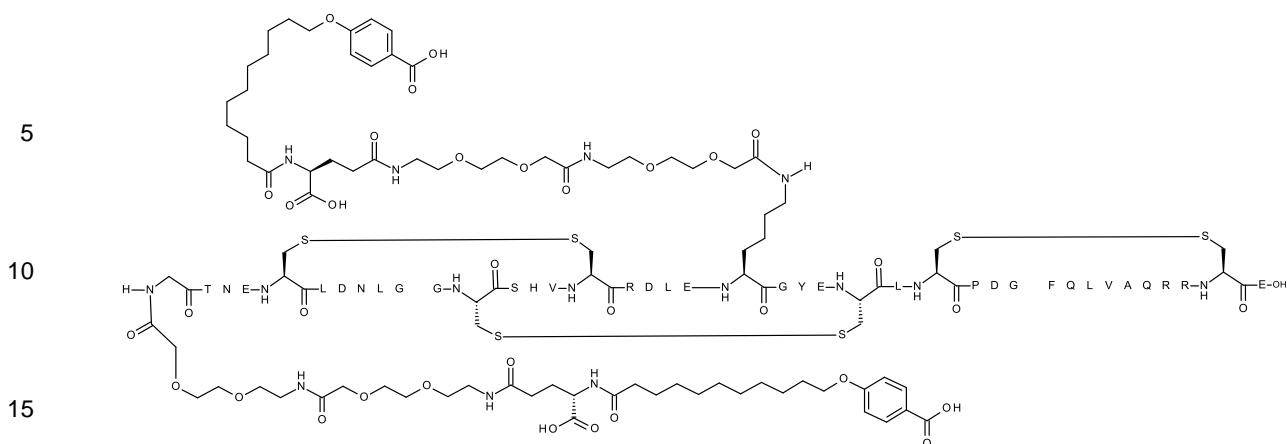


55 Compuesto preparado mediante el método general B
LCMS01: m/4 encontrada = 1469,1; m/5 encontrada = 1175,5; masa calc. = 5874,6

Ejemplo 88

60 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-péptido

65



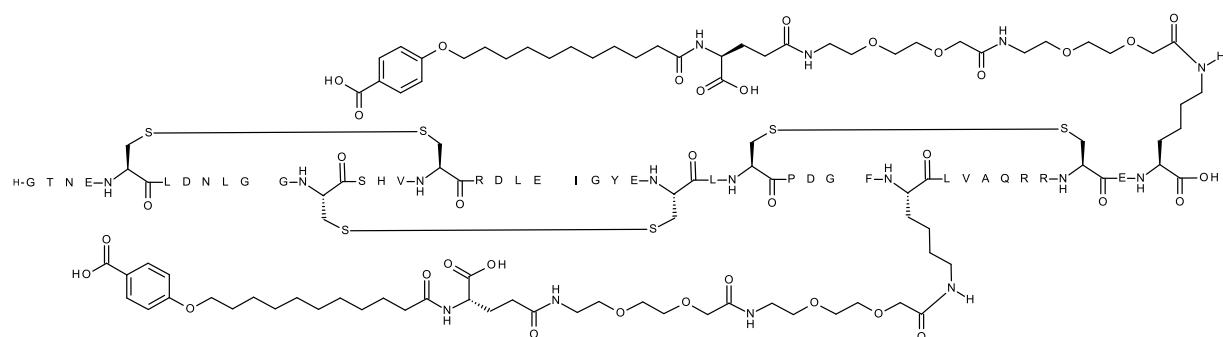
El péptido es la SEQ ID NO: 39.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1469,3; m/5 encontrada = 1175,7; masa calc. = 5874,5

25 Ejemplo 89

30 N{alfa}{N{épsilon}-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



45 El péptido es la SEQ ID NO:72.

Compuesto preparado mediante el método general B

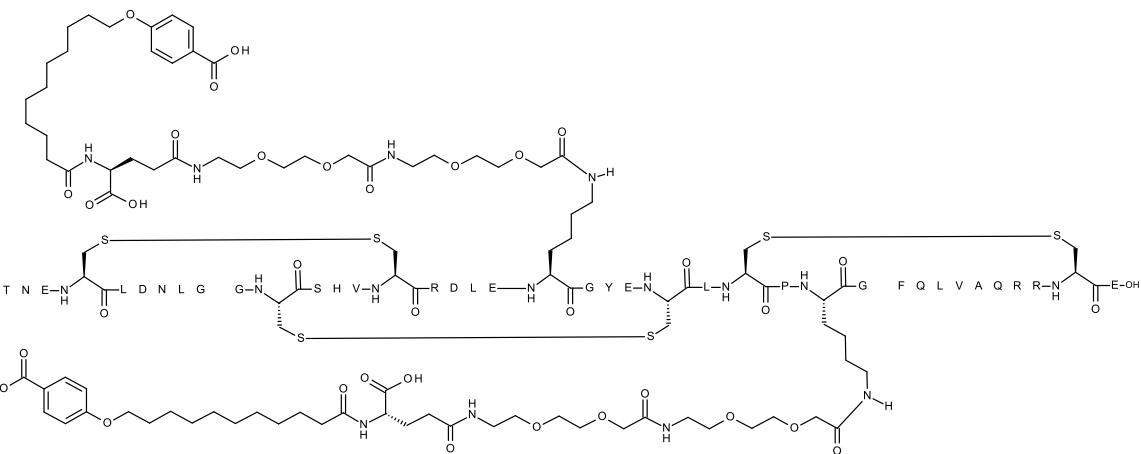
LCMS01: m/4 encontrada = 1497,6; m/5 encontrada = 1198,3; masa calc. = 5987,7

50 Ejemplo 90

55 N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon}-321}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys321]-LDL-R-(293-332)-péptido

60

65

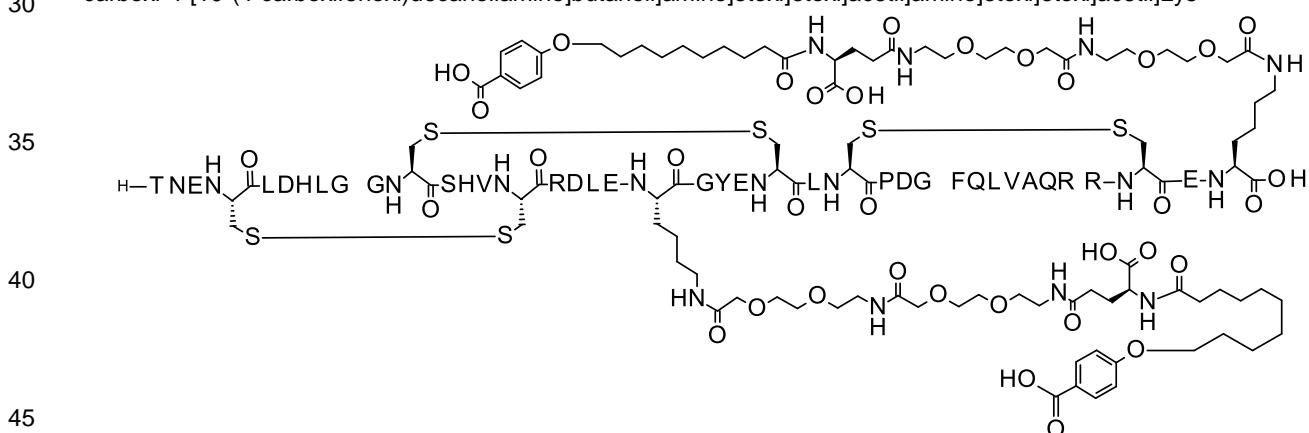


20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1472,6; m/5 encontrada = 1178,3; masa calc. = 5887,6

25 Ejemplo 91

30 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313],des-Gly293-LDL-R-(294-332)-peptidil)-N{épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



50 Compuesto preparado mediante el método general B

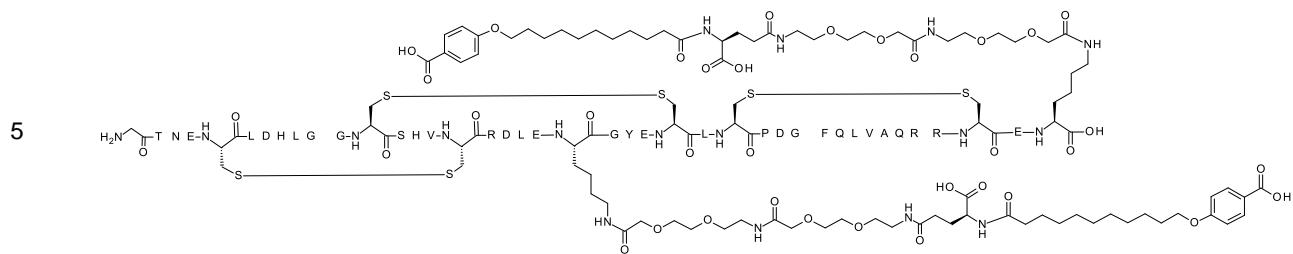
LC-MS: m/3 encontrada = 1981, m/4 = 1486: Masa calculada = 5940,6

Ejemplo 92

55 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

60

65



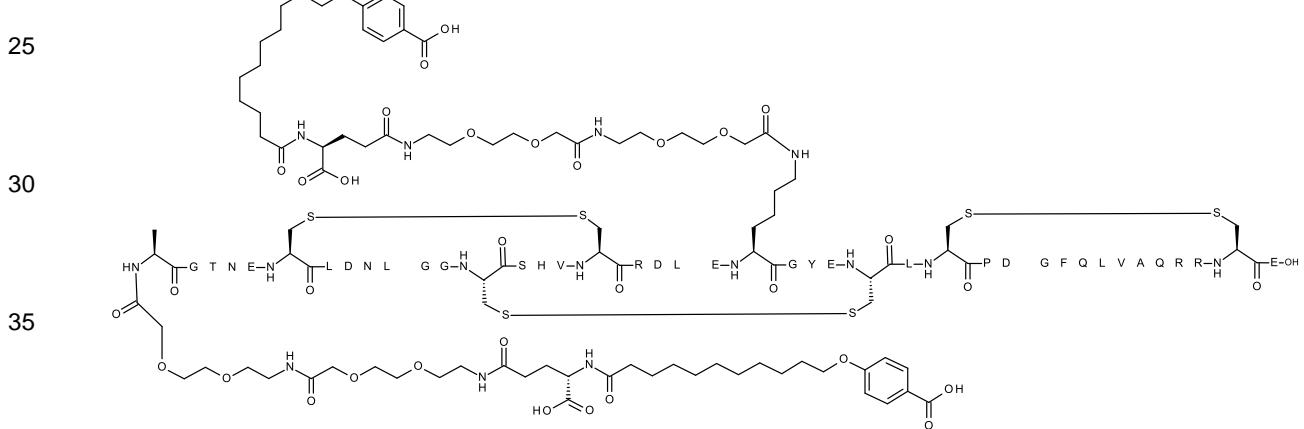
El péptido es la SEQ ID NO: 39.

Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS01: m/4 encontrada = 1507,3 m/5 encontrada = 1205,9 masa calc. = 6025,7

Ejemplo 93

20 N{292}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-Ala[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-péptido



40 El péptido es la SEQ ID NO: 75.

Compuesto preparado mediante el método general B

45 LCMS01: m/4 encontrada = 1487,1; m/5 encontrada = 1190,0; masa calc. = 5945,6

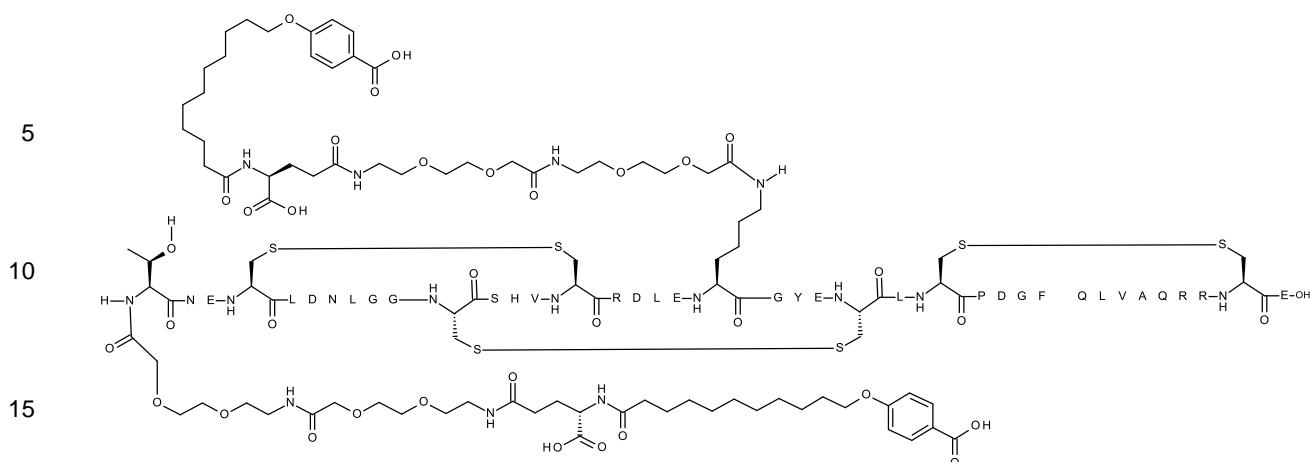
Ejemplo 94

50 N{294}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313], des-Gly293-LDL-R-(294-332)-péptido

55

60

65



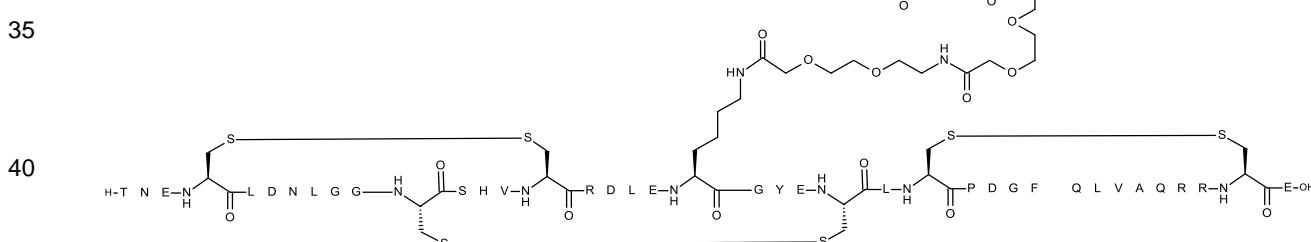
El péptido es la SEQ ID NO: 76.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1455,1; masa calc. = 5817,5

25 Ejemplo 95

30 N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313],des-Gly293-LDL-R-(294-332)-péptido



45 El péptido es la SEQ ID NO: 76.

Compuesto preparado mediante el método general B

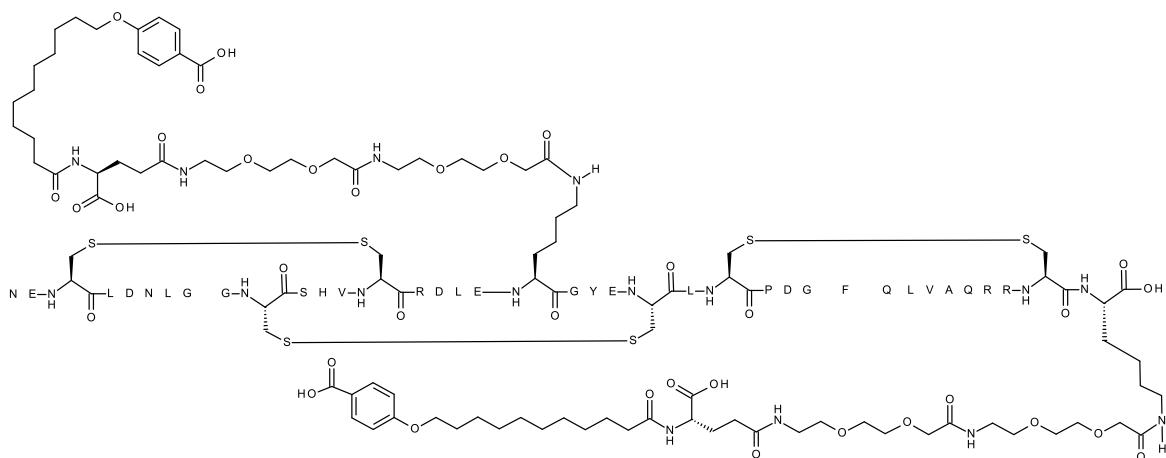
LCMS01: m/4 encontrada = 1272,4; m/5 encontrada = 1017,9; masa calc. = 5085,7

50 Ejemplo 96

55 N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido

60

65



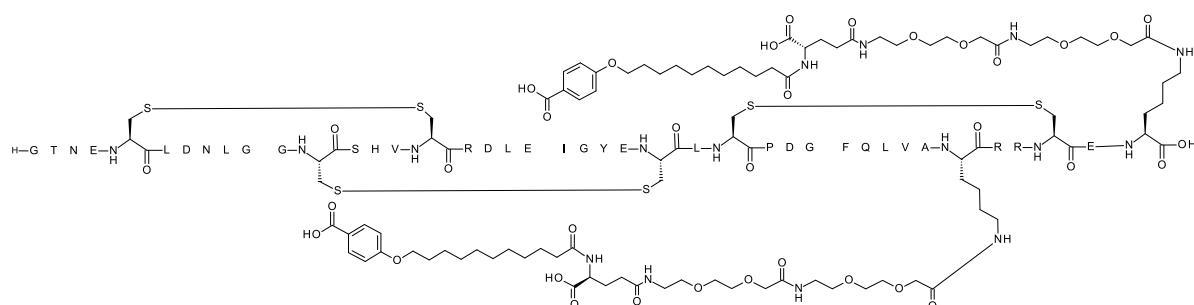
El péptido es la SEQ ID NO: 77.

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1469,1; m/5 encontrada = 1175,5; masa calc. = 5873,6

25 Ejemplo 97

30 N{alfa}{N{épsilon}-328}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys328]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



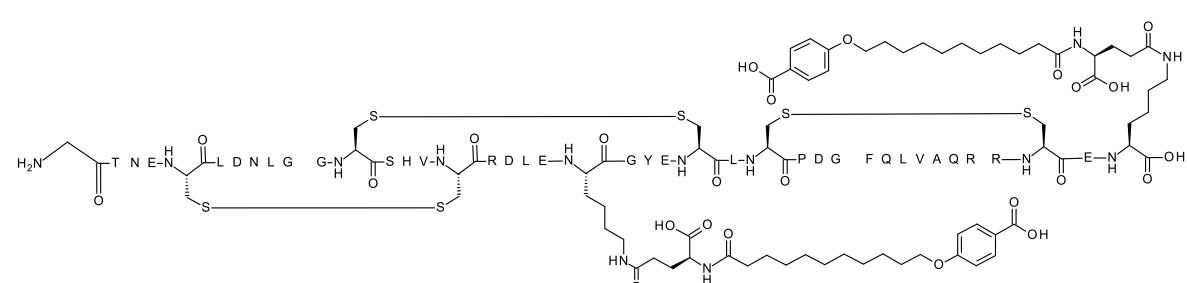
El péptido es la SEQ ID NO: 78.

45 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS28: m/3 encontrada = 1996,9; m/4 encontrada = 1497,9; masa calc. = 5987,7

50 Ejemplo 98

55 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]Lys



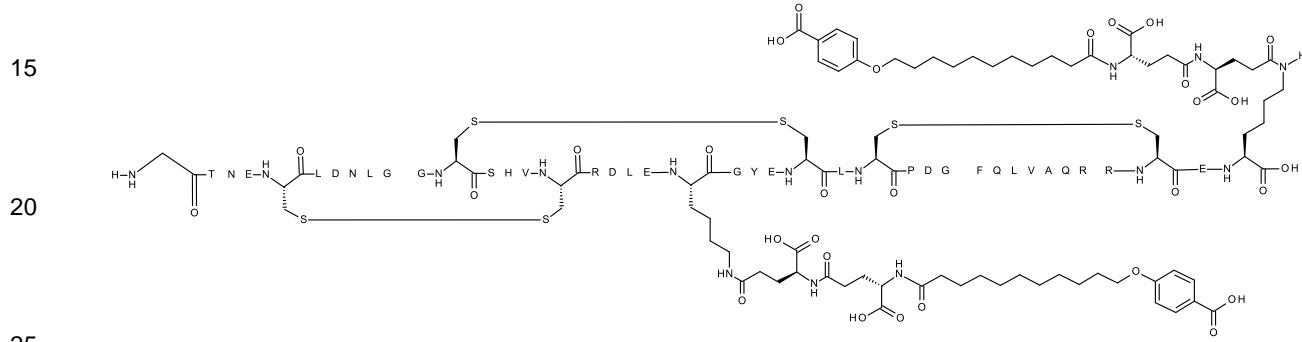
El péptido es la SEQ ID NO:32.

Compuesto preparado mediante el método general B

5 LCMS01: m/3 encontrada = 1808,1; m/4 encontrada = 1356,4; m/5 encontrada = 1085,3; masa calc. = 5422,1

Ejemplo 99

10 N{Alpha}{N{Epsilon}-313}-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil][Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R(293-332)--peptidil)-
N{épsilon}][(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]Lys

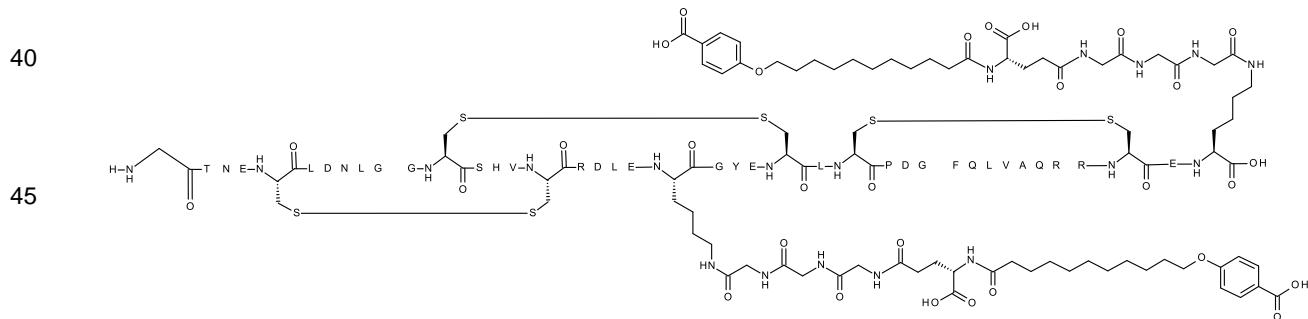


El péptido es la SEQ ID NO: 32.

Compuesto preparado mediante el método general B

30 LCMS01: m/3 encontrada = 1894,2; m/4 encontrada = 1420,9; m/5 encontrada = 1136,9; masa calc. = 5680,3
Ejemplo 100

35 N{alpha}{N{épsilon}-313}-[2-[[2-[[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]acetil]amino]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-
R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}][2-[[2-[[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]acetil]amino]acetil]amino]acetil]Lys



El péptido es la SEQ ID NO: 32.

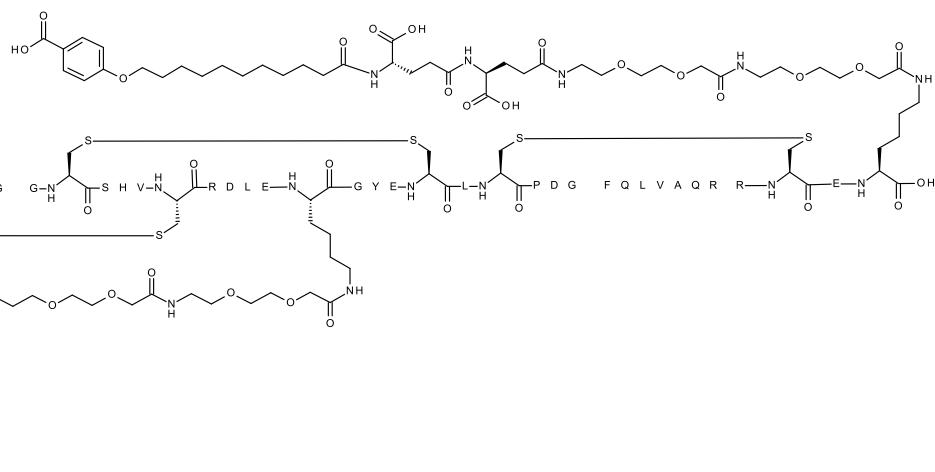
Compuesto preparado mediante el método general B

55 LCMS01: m/3 encontrada = 1922,2; m/4 encontrada = 1441,9; m/5 encontrada = 1153,7; masa calc. = 5764,4

Ejemplo 101

60 N{alpha}{N{épsilon}-313}-[2-[[2-[[2-[[2-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}][2-[[2-[[2-[[2-[(4S)-4-
carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

65



El péptido es la SEQ ID NO: 32.

20

Compuesto preparado mediante el método general B

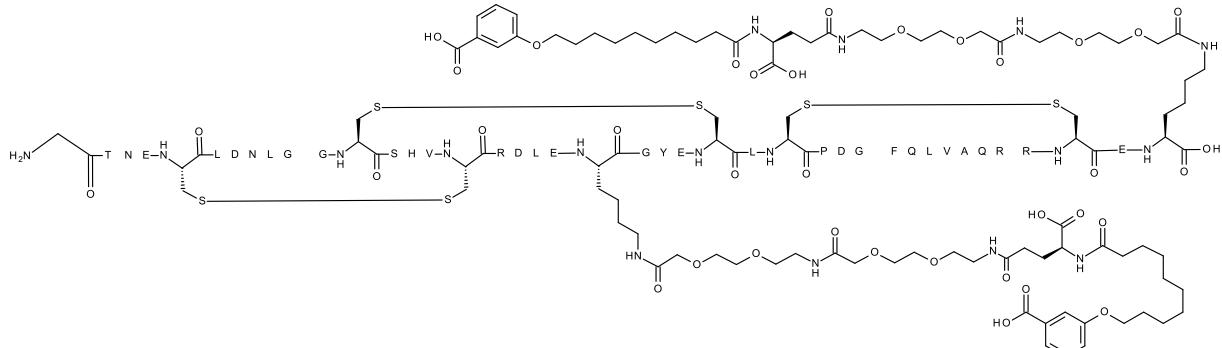
LCMS01: m/4 encontrada = 1566,2; m/5 encontrada = 1252,9; masa calc. = 6260,9

25

Ejemplo 102

30

N{alfa}{N{épsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil}-{Leu301,Arg309,Glu312,Lys313}-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(3-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



El péptido es la SEQ ID NO: 32.

50

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada=1494,6; m/5= 1195,9 masa calc. = 5974,6

Ejemplo 103

55

Ala299,Leu301,Ile307,Arg309-LDL-R-(293-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 79.

65

Compuesto preparado mediante el método general A.

LCMS01: m/2 encontrada = 2191,4; m/3 encontrada = 1461,0; Calc = 4381,0

Ejemplo 104 (comparador, no de acuerdo con las reivindicaciones)

5 Leu301,Arg309,Lys310-LDL-R-(293-332)-péptido



El péptido es la SEQ ID NO: 80.

15 Compuesto preparado mediante el método general A

LCMS01: m/3 encontrada = 1475,3; m/4 encontrada = 1107,0; Calc = 4424,0

Ejemplo 105

20 Leu301-LDL-R-(293-332)-péptido



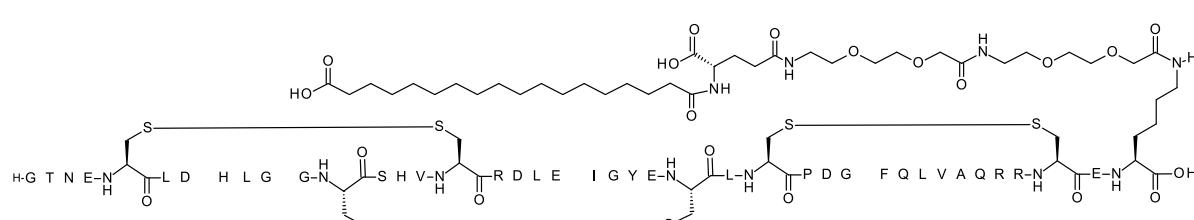
El péptido es la SEQ ID NO: 81.

30 Compuesto preparado mediante el método general A

LCMS01: m/3 encontrada = 1456,3; m/4 encontrada = 1217,0; Calc = 4368,9

Ejemplo 106

35 N{alfa}{[His300,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}{[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 82.

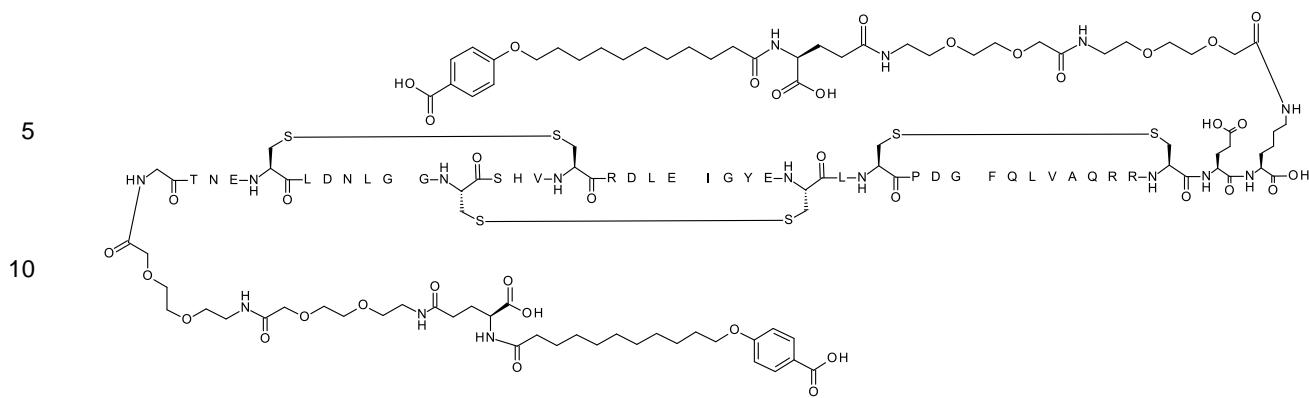
50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS027: m/3 encontrada = 1760,5; m/4 encontrada = 1320,6; m/5 encontrada = 1056,7; masa calc. = 5279,0

Ejemplo 107

55 N{alfa}{N{293}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}{[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

60



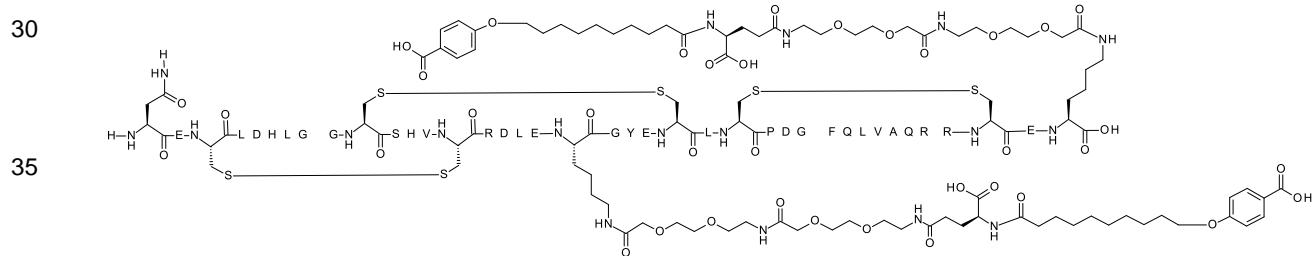
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 4

Compuesto preparado mediante el método general B

20 | CMS29: m/3 encontrada = 1996.9; m/4 encontrada = 1497.9; m/5 encontrada = 1198.6; masa calc. = 5987.7

Ejemplo 108

25 N{alpha}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-
carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(295-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[10-
(4-carboxifenoxy)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



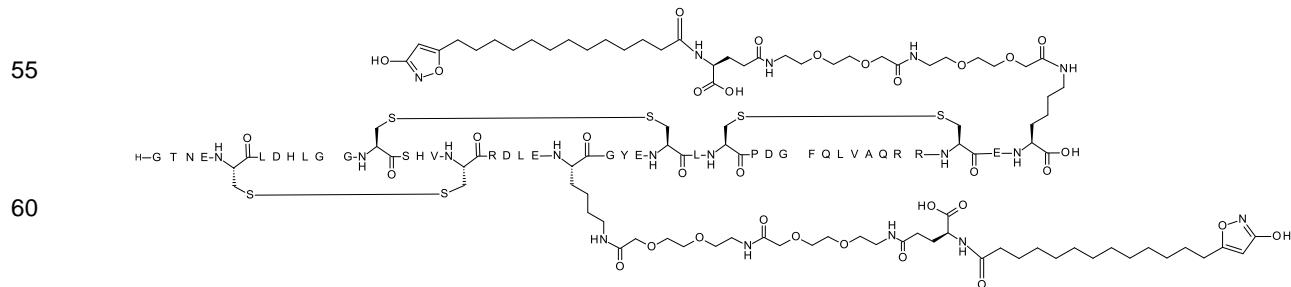
40 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 83

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1460,8; m/5 encontrada = 1168,7; masa calc. = 5839,5

43 Ejemplo 109

50 N{alpha}(N{épsilon}-313)-[2-[2-[2-[2-[2-[4-(4S)-4-carboxi-4-[13-(3-hidroxi-1,2-oxazol-5-
il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-
LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[4-(4S)-4-carboxi-4-[13-(3-hidroxi-1,2-oxazol-5-
il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



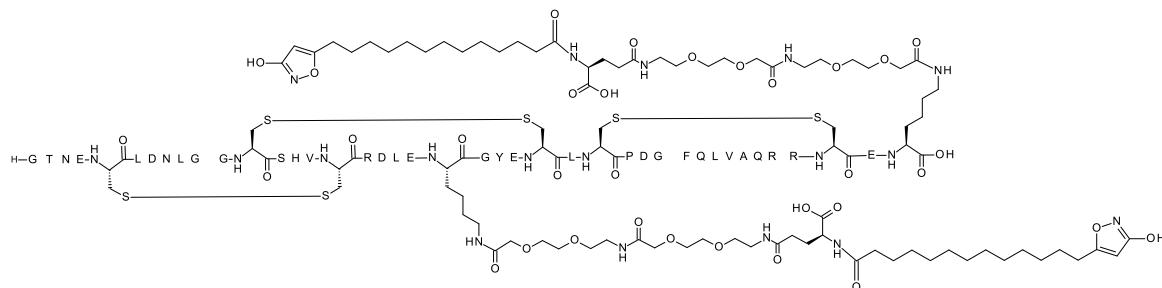
65 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 69

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1495,0; m/5 encontrada = 1196,0; masa calc. = 5975,7

5 Ejemplo 110

10 N{alpha}{N{epsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(3-hidroxi-1,2-oxazol-5-
il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-
(293-332)-peptidil)-N{epsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(3-hidroxi-1,2-oxazol-5-
il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



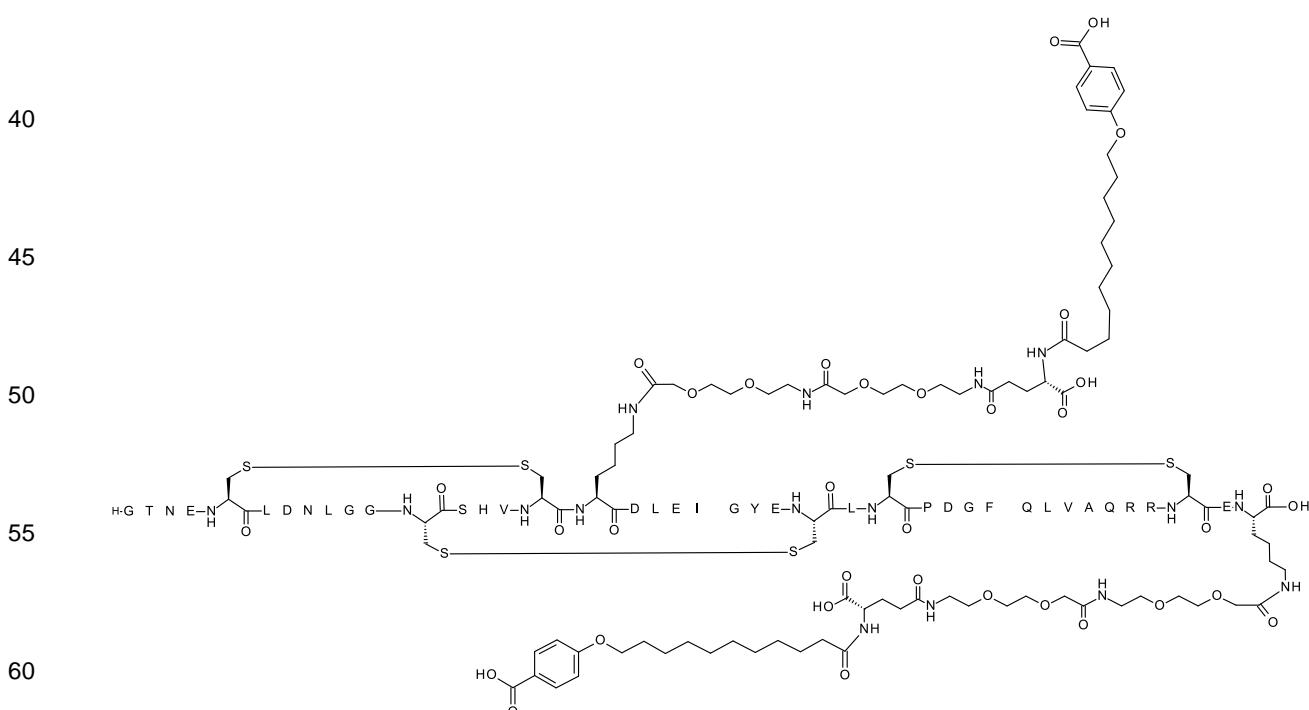
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

25 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1489,0; m/5 encontrada = 1191,0; masa calc. = 5952,7

30 Ejemplo 111

35 N{alpha}{N{epsilon}-309}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312]-
LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



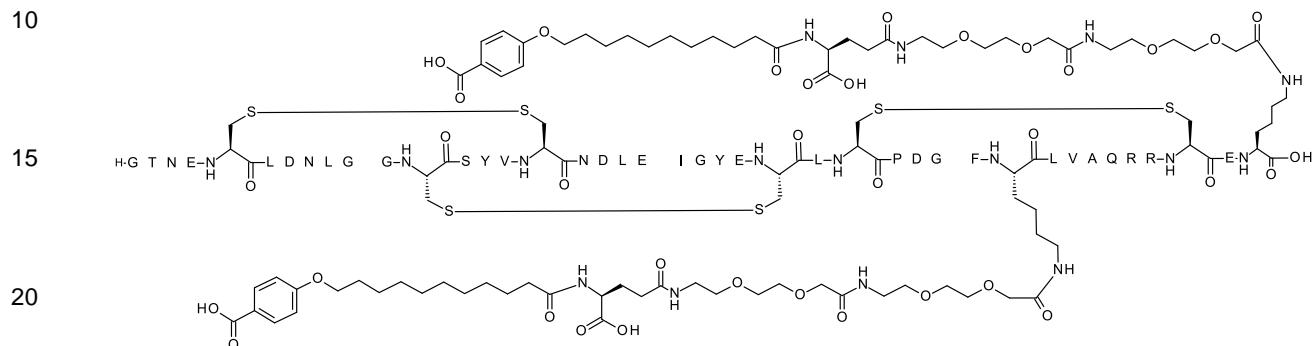
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:84

65 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1987,6; m/4 encontrada = 1490,9; m/5 encontrada = 1193,0; masa calc. = 5959,7

Ejemplo 112

5 N{alfa}{N{épsilon}-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Tyr306,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



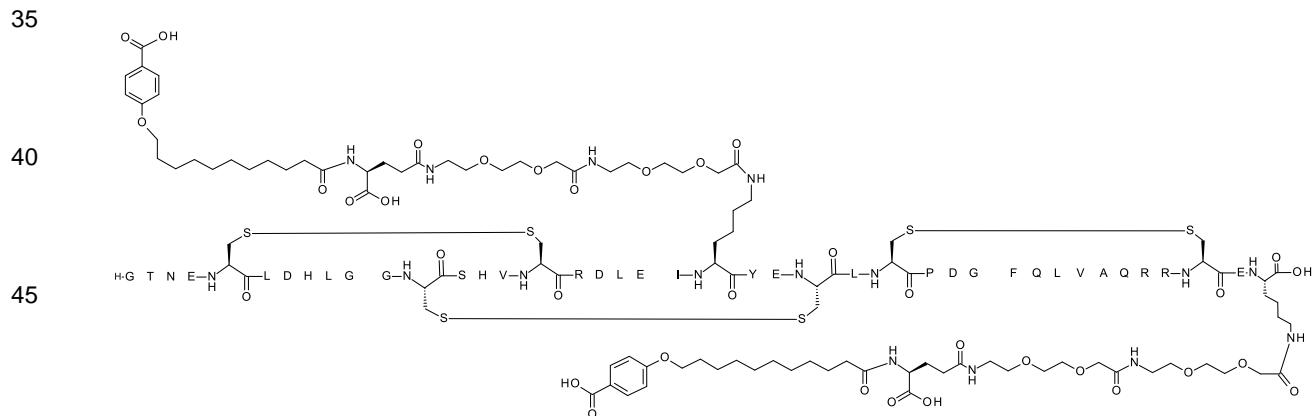
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 85

25 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1991,6; m/4 encontrada = 1493,9; m/5 encontrada = 1195,1; masa calc. = 5971,7

Ejemplo 113

30 N{alfa}{N{épsilon}-314}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys314]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-
(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



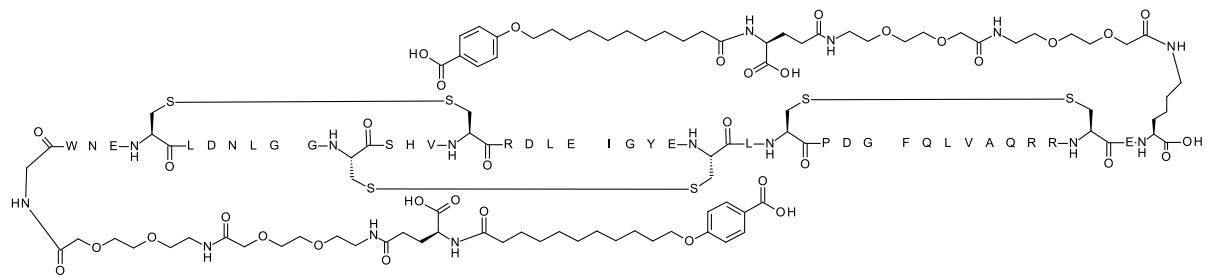
50 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 86

Compuesto preparado mediante el método general B

55 LCMS29: m/3 encontrada = 2028,3; m/4 encontrada = 1521,5; masa calc. = 6081,8

Ejemplo 114

60 N{alfa}{N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Trp294,Leu301,Arg309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



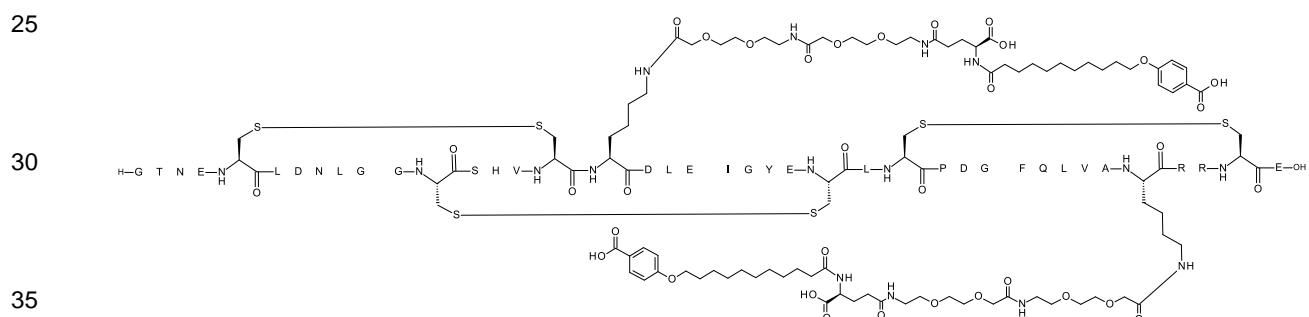
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 87

15 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 2025,3; m/4 encontrada = 1519,2; m/5 encontrada = 1215,6; masa calc. = 6072,8

Ejemplo 115

20 N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-328}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312,Lys328]-LDL-R-(293-332)-péptido



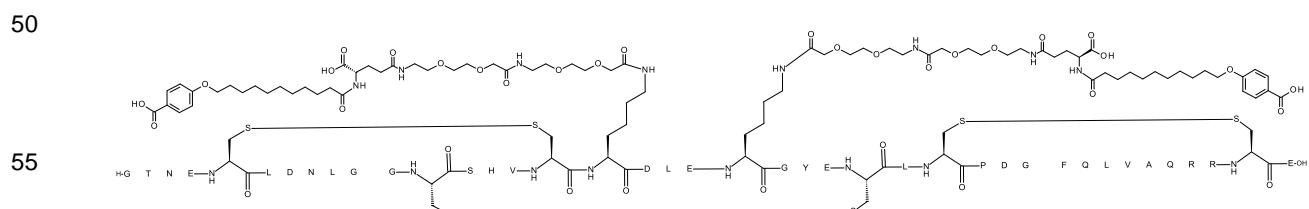
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 88

40 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS27: m/2 encontrada = 2916,7; m/3 encontrada = 1944,9; m/4 encontrada = 1458,9; masa calc. = 5831,5

Ejemplo 116

45 N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-péptido



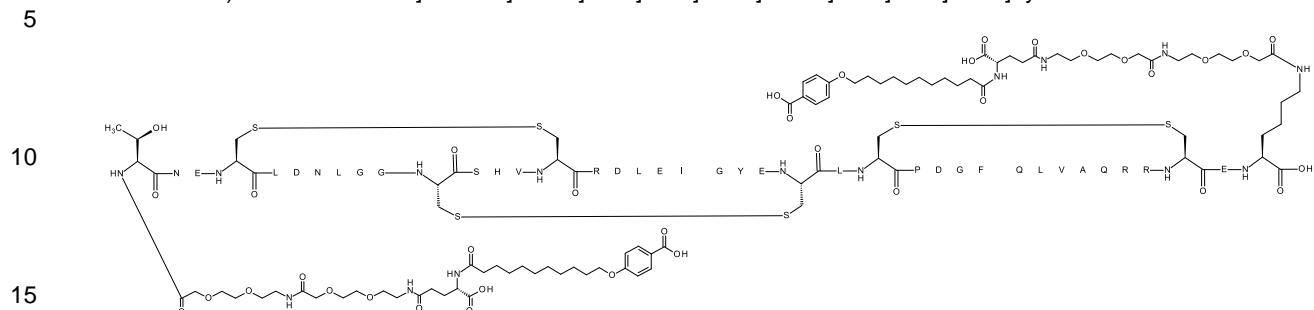
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 89

60 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2924,1; m/3 encontrada = 1949,6 m/4 encontrada = 1462,4; masa calc. = 5846,5

65 Ejemplo 117

5 N{alfa}{N{294}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312],des-Gly293-LDL-R-(294-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]-[amino]etoxi]acetil]Lys



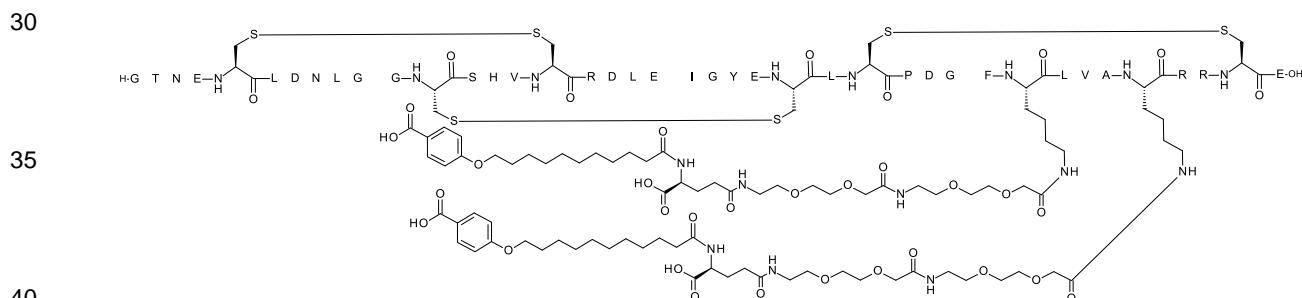
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 90

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1977,6; m/4 encontrada = 1483,5; m/5 encontrada = 1187,2; masa calc. = 5930,6

Ejemplo 118

25 N{épsilon}-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon}-328}-[2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys324,Lys328]-LDL-R-(293-332)-péptido



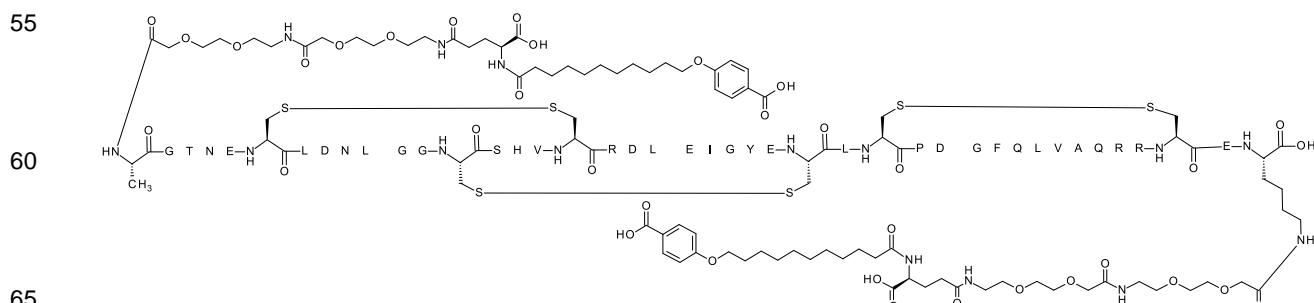
40 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 91

45 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS27: m/2 encontrada = 2930,4; m/3 encontrada = 1953,9; m/4 encontrada = 1465,7; masa calc. = 5859,6

Ejemplo 119

50 N{alfa}{N{292}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-Ala[Leu301,Arg309,Glu312]-
LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]-[amino]etoxi]acetil]Lys



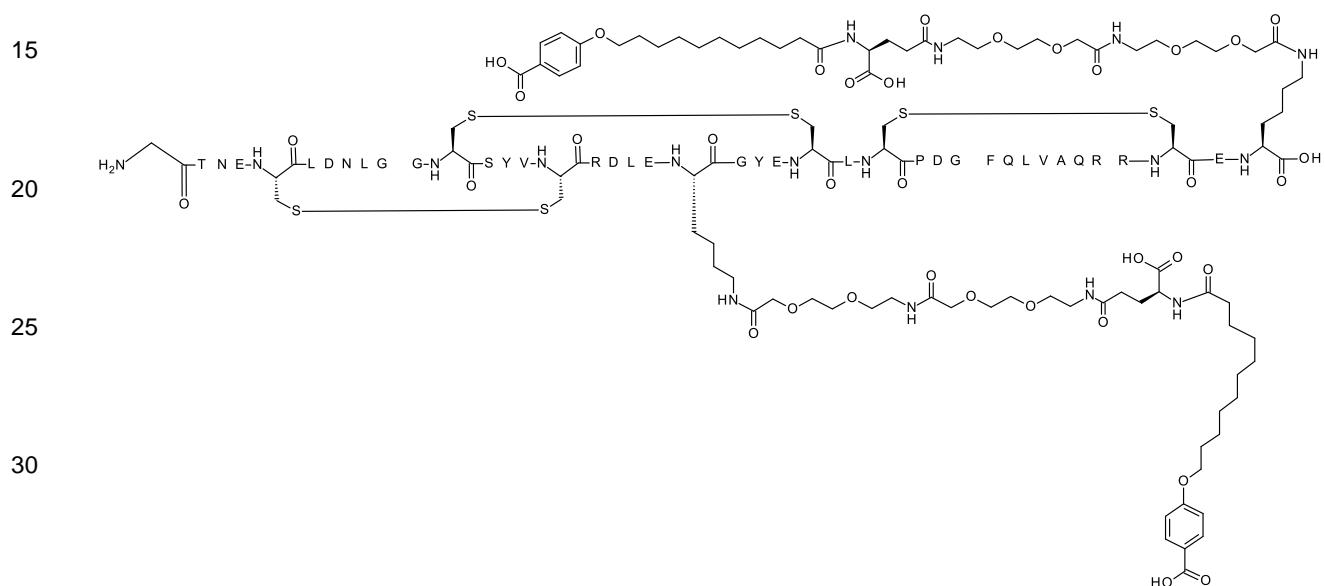
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 92

Compuesto preparado mediante el método general B

5 LCMS29: m/3 encontrada = 2020.6; m/4 encontrada = 1515.7; m/5 encontrada = 1212.8; masa calc. = 6058.8

Ejemplo 120

10 N{alfa}{N{épsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Tyr306,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



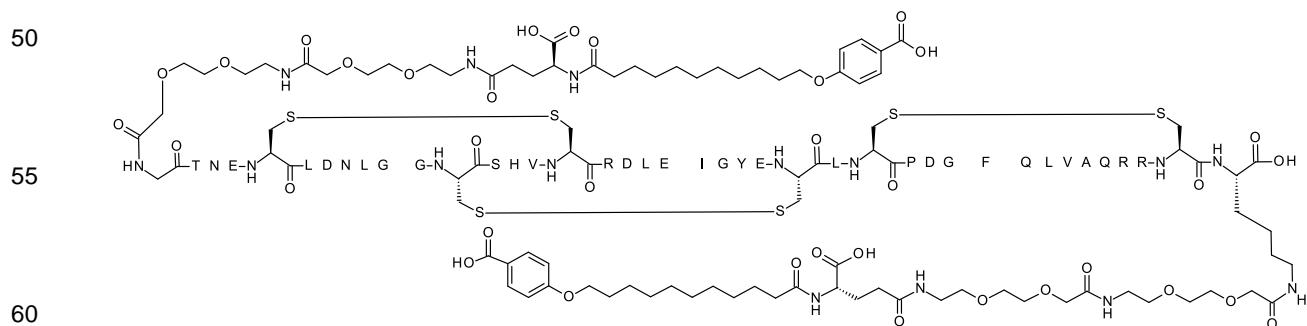
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 93

Compuesto preparado mediante el método general B

40 LCMS29: m/3 encontrada = 2010,2; m/4 encontrada = 1508,2; m/5 encontrada = 1206,8; masa calc. = 6028,7

Ejemplo 121

45 N{293}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil},N{épsilon}-332}-{2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



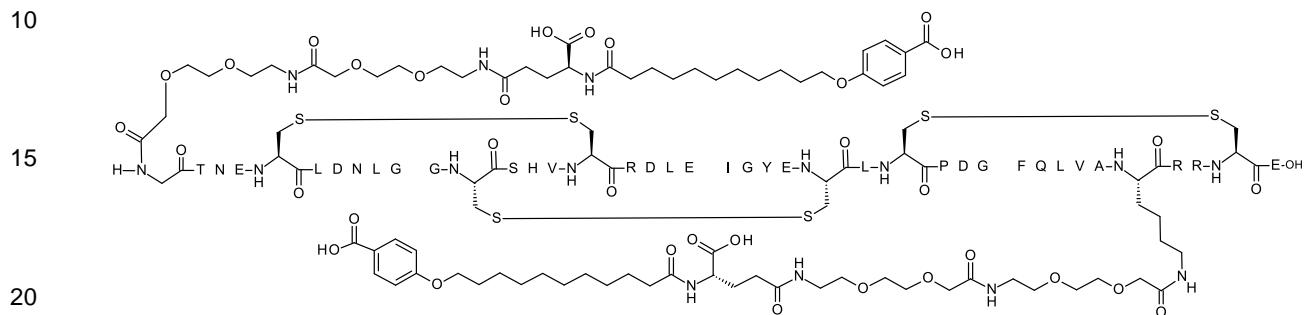
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 11

65 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS27: m/2 encontrada = 2930,3; m/3 encontrada = 1953,7; m/4 encontrada = 1465,8; masa calc. = 5858,6

Ejemplo 122

- 5 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-328}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys328]-LDL-R-(293-332)-péptido



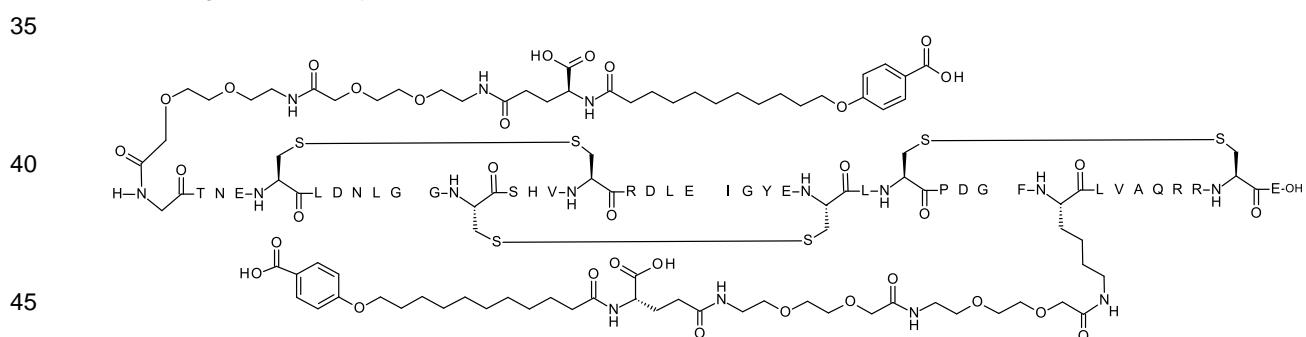
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 40

- 25 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS27: m/2 encontrada = 2930,1; m/3 encontrada = 1953,9; m/4 encontrada = 1465,7; masa calc. = 5859,6

Ejemplo 123

- 30 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-324}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-péptido



La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 22

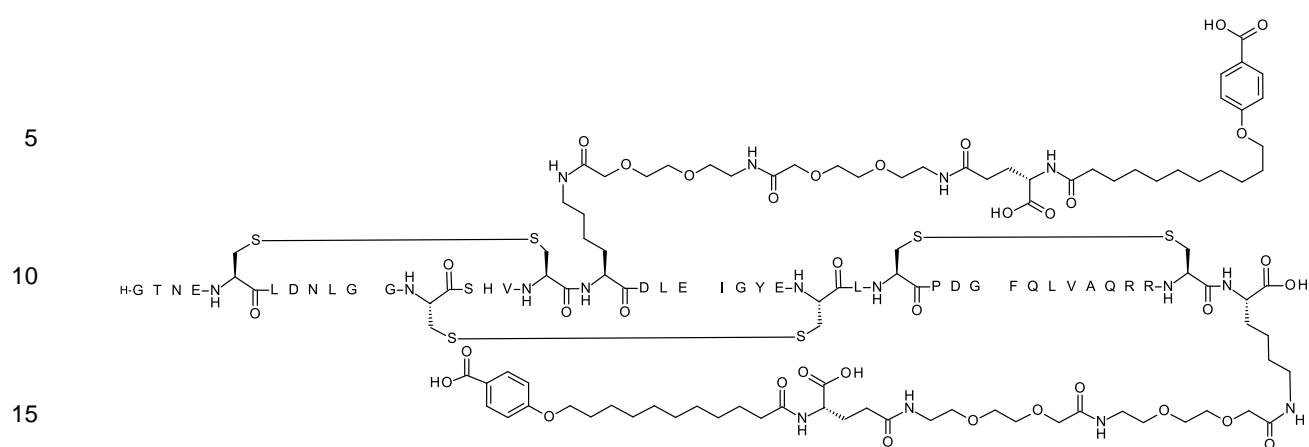
- 50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2930,9; m/3 encontrada = 1954,3; m/4 encontrada = 1465,9; masa calc. = 5859,6

Ejemplo 124

- 55 N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido

60

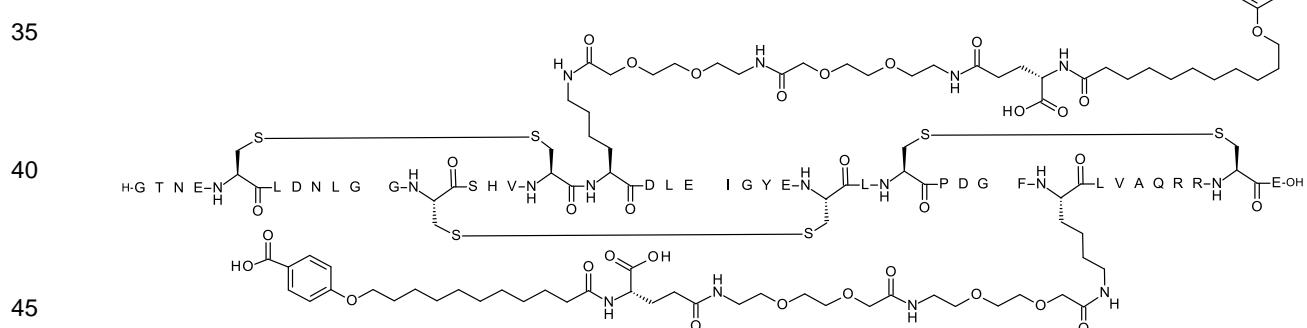


20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2916,1; m/3 encontrada = 1944,2; m/4 encontrada = 1458,4; masa calc. = 5830,6

25 Ejemplo 125

30 N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-324}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-péptido

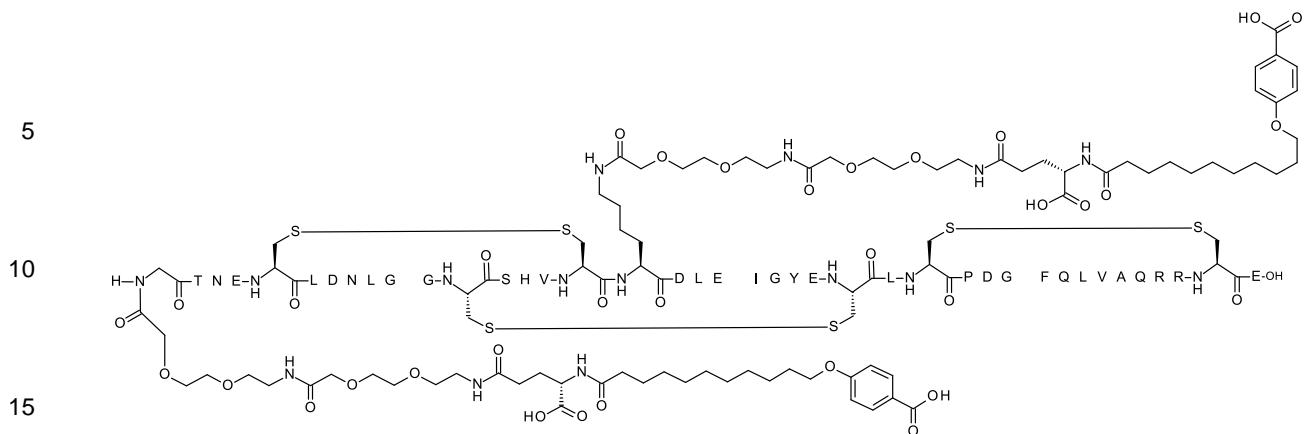


50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2916,6; m/3 encontrada = 1944,5; m/4 encontrada = 1458,9; masa calc. = 5831,5

55 Ejemplo 126

60 N{293}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil],N{épsilon-309}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Lys309,Glu312]-LDL-R-(293-332)-péptido



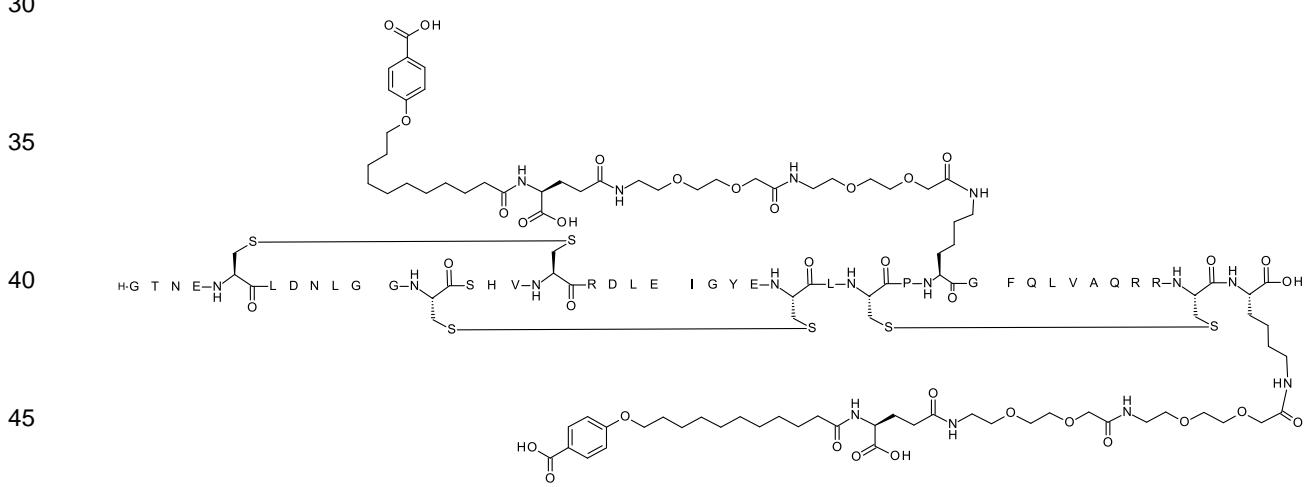
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 30

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2916,7; m/3 encontrada = 1944,6; m/4 encontrada = 1458,7; masa calc. = 5831,5

Ejemplo 127

25 N{épsilon-321}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-332}-[2-[2-[2-[2-[
2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys321,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



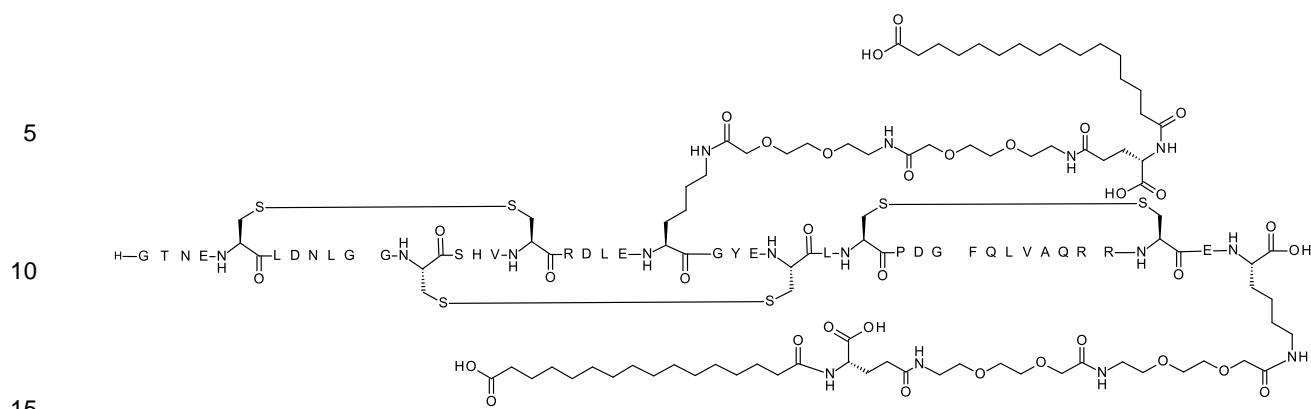
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 95

50

LCMS200: m/z encontrada = 1059.2; m/z/4 encontrada = 1419.0; massa real = 5971.6

55 Example 128

60 N{alfa}(N{épsilon}-313)-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



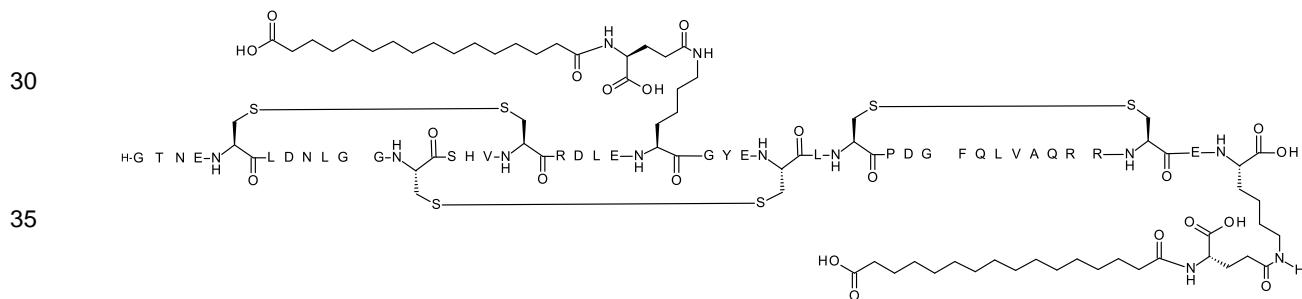
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

20 LCMS29: m/2 encontrada = 2966,28; m/3 encontrada = 1978,0; m/4 encontrada = 1483,5; masa calc. = 5930,7

Ejemplo 129

25 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil-N{épsilon}{(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]Lys



40 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

45 LCMS29: m/2 encontrada = 2676,0; m/3 encontrada = 1784,2; m/4 encontrada = 1338,4; masa calc. = 5330,1

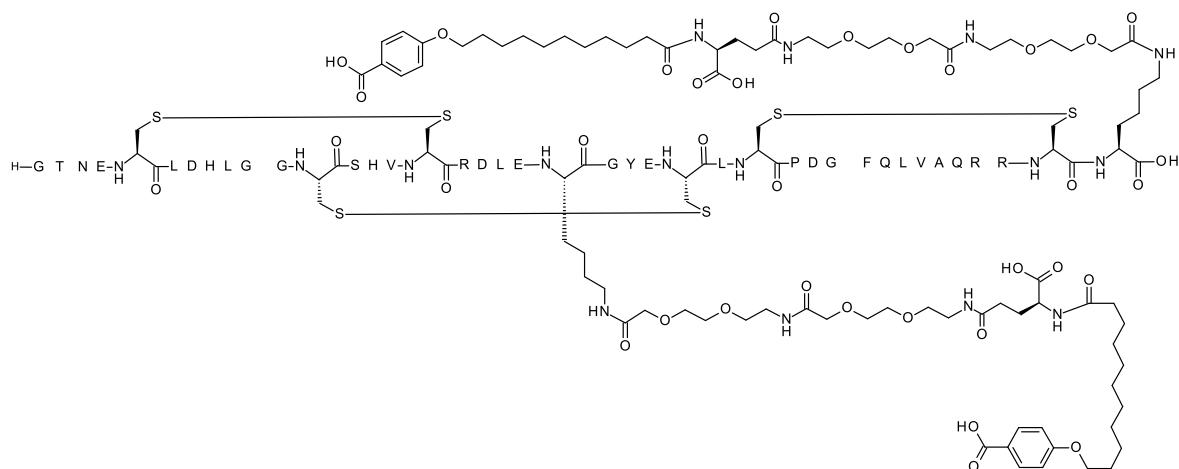
Ejemplo 130

50 N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon}-332}-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido

55

60

65



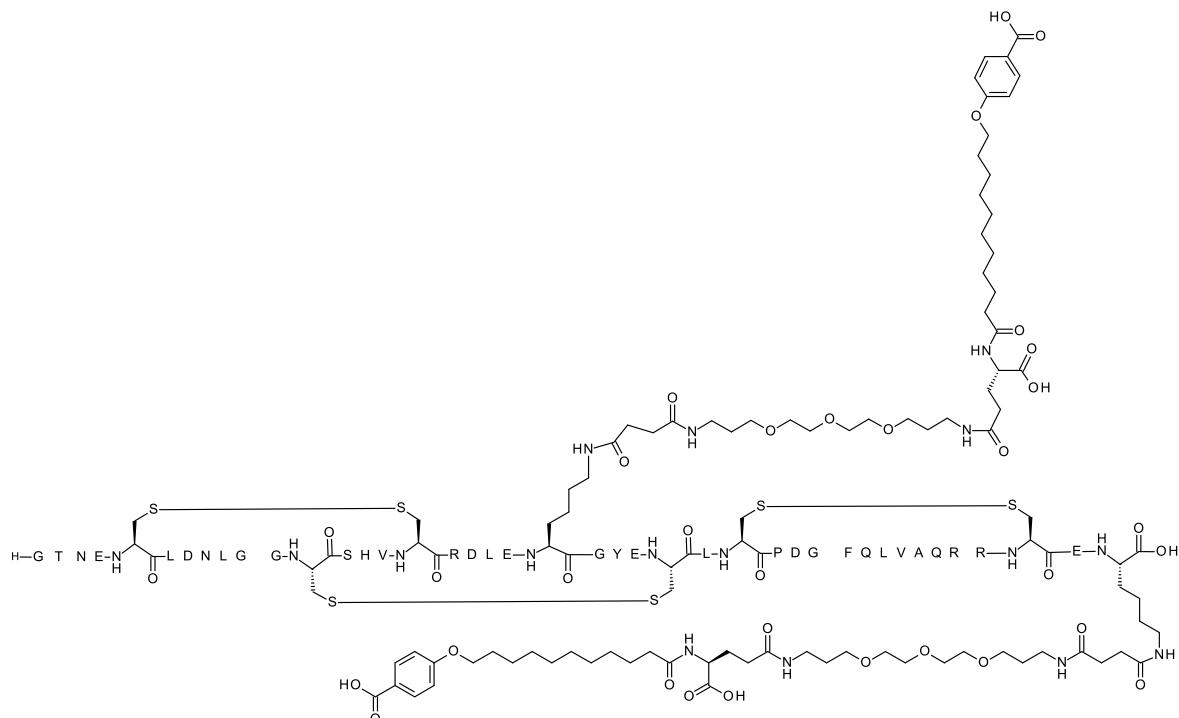
20 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 96

25 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1966,7; m/4 encontrada = 1475,0; masa calc. = 5896,6

30 Ejemplo 131

35 N{alfa}{N{épsilon}-313}-{4-[3-[2-[3-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]propilamino}-4-oxobutanoil]-
40 [Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}{4-[3-[2-[3-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]propilamino}-4-oxobutanoil]Lys



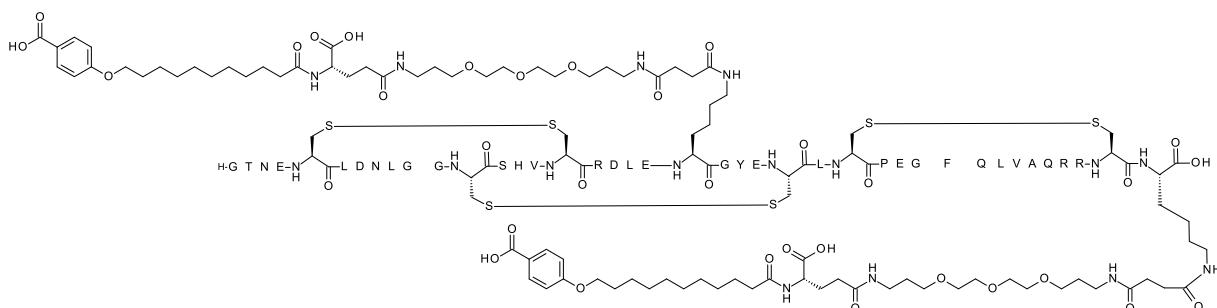
60 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

65 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 2009,9; m/4 encontrada = 1507,7; masa calc. = 6026,8

Ejemplo 132

5 N{épsilon-313}-[4-[3-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-4-oxobutanoil], N{épsilon-332}-[4-[3-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]propoxi]etoxi]etoxi]propilamino]-4-oxobutanoil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321,Lys332]-LDL-R-(293-332)-péptido



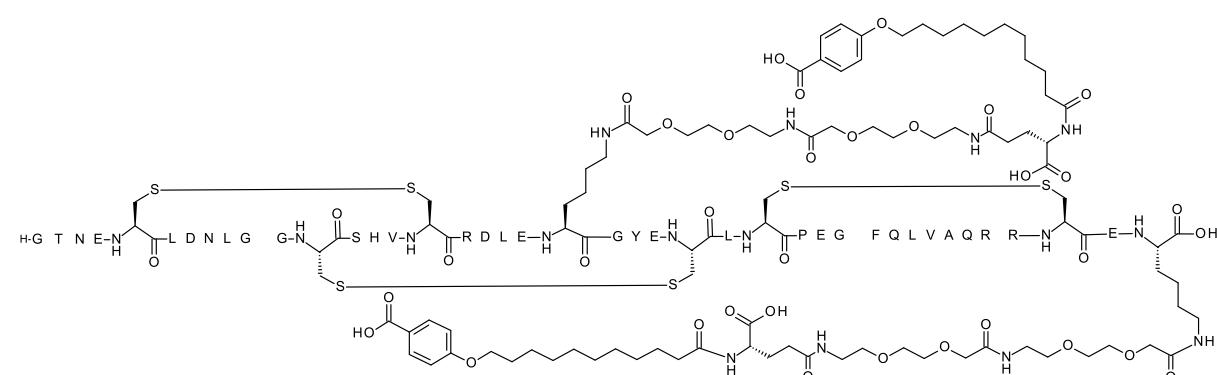
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 97

20 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1971,3; m/4 encontrada = 1478,9; masa calc. = 5911,7

25 Ejemplo 133

30 N{alfa}{N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}{[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



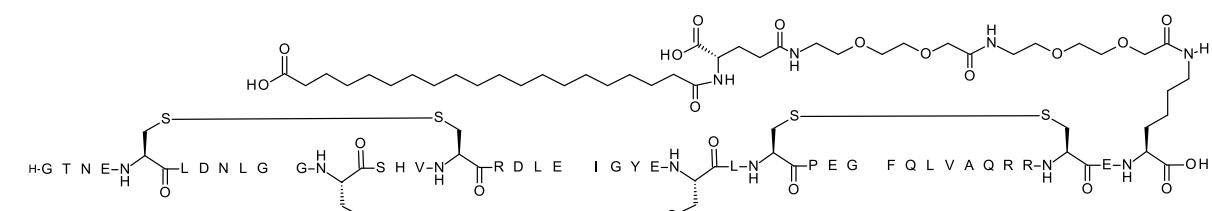
45 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98

50 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1505,0; m/5 encontrada = 1204,3; masa calc. = 6016,7

55 Ejemplo 134

55 N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}{[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



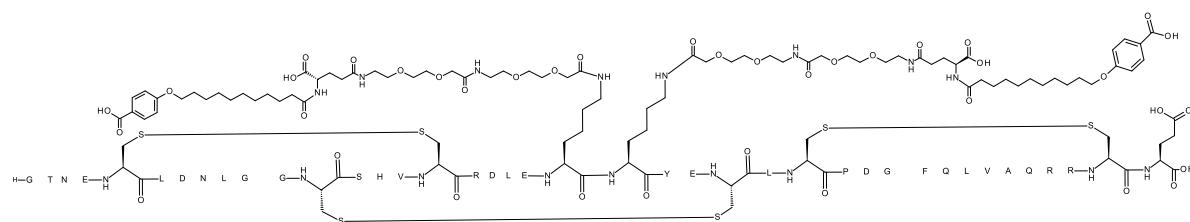
65 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 19

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1766,7; m/5 encontrada = 1325,3; masa calc. = 5258,0

5 Ejemplo 135

10 N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-314}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys314]-LDL-R-(293-332)-péptido



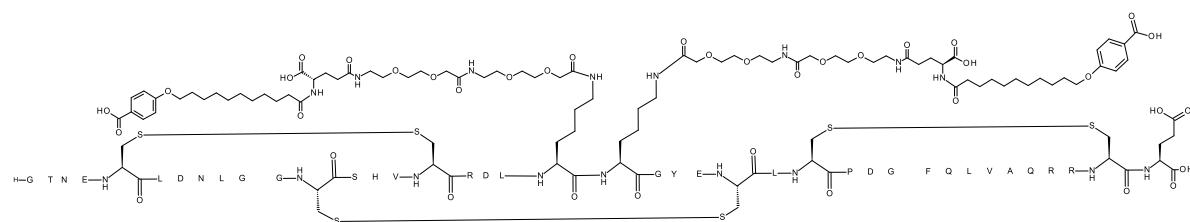
20 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 99

Compuesto preparado mediante el método general B

25 LCMS01: m/4 encontrada = 1487,3; m/5 encontrada = 1190,0; masa calc. = 5945,6

Ejemplo 136

30 N{épsilon-312}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Lys313]-
LDL-R-(293-332)-péptido



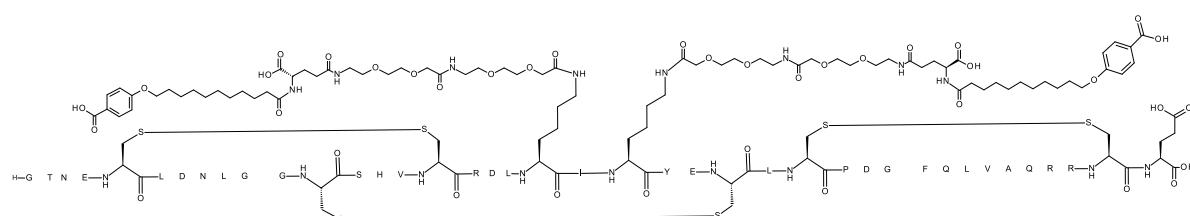
40 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 100

45 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1469,3; m/5 encontrada = 1175,5; masa calc. = 5873,6

50 Ejemplo 137

55 N{épsilon-312}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-314}-[2-[2-[2-[2-
[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Lys314]-LDL-R-(293-332)-péptido



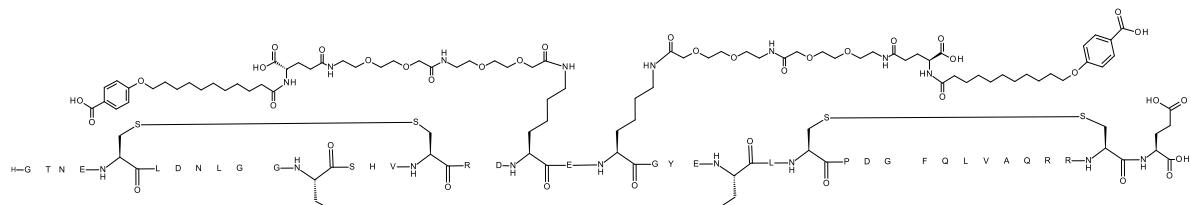
65 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 101

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1483,3; m/5 encontrada = 1186,8; masa calc. = 5929,7

5 Ejemplo 138

10 N{épsilon-311}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil], N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Lys311,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-péptido



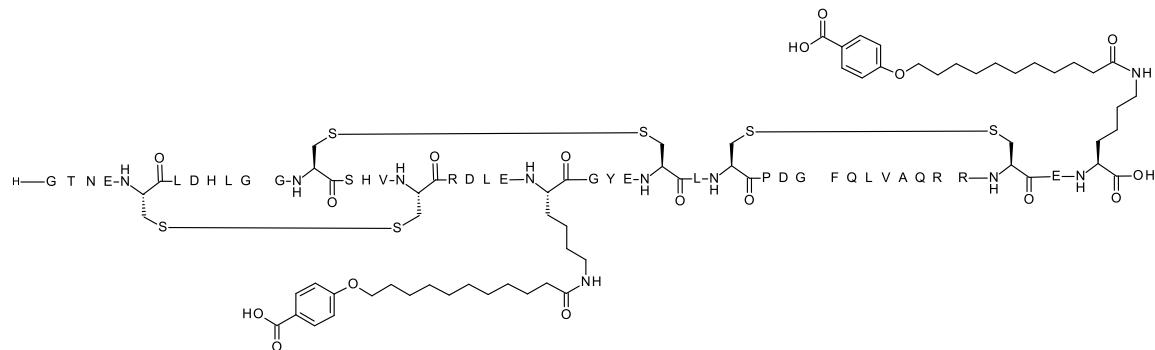
20 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 102

Compuesto preparado mediante el método general B

25 LCMS01: m/4 encontrada = 1473,0; m/5 encontrada = 1178,6; masa calc. = 5889,5

Ejemplo 139

30 N{alfa}(N{épsilon-313}-11-(4-carboxifenoxy)undecanoil-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}11-(4-carboxifenoxy)undecanoilLys



45 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 69

Compuesto preparado mediante el método general B

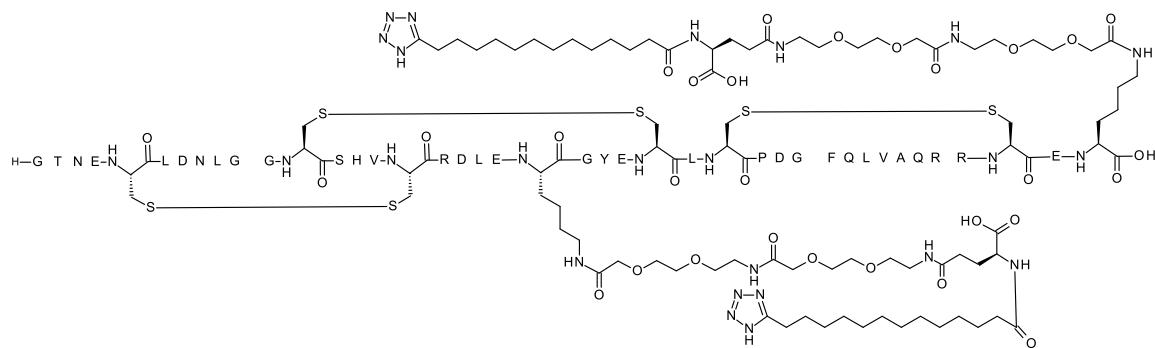
50 LCMS01: m/4 encontrada = 1297,4; m/5 encontrada = 1038,2; masa calc. = 5186,9

Ejemplo 140

55 N{alfa}(N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(1H-tetrazol-5-il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(1H-tetrazol-5-il)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

60

65



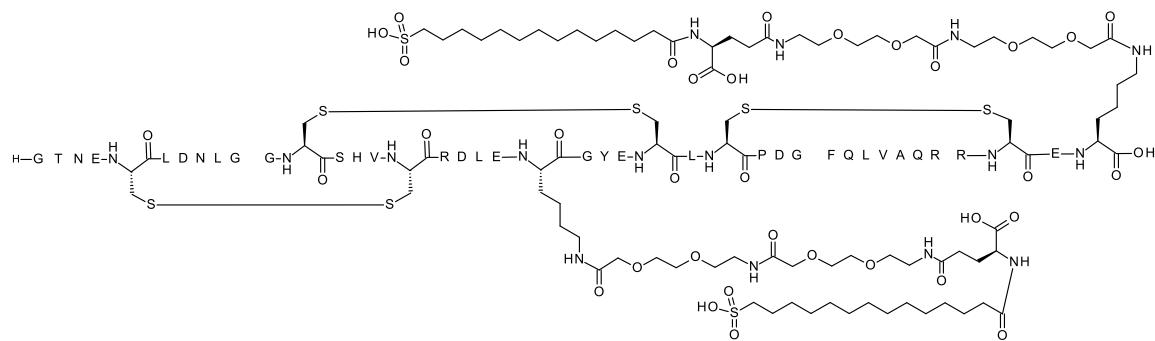
15 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1481,6; m/5 encontrada = 1185,3; masa calc. = 5922,7

20 Ejemplo 141

25 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(14-sulfotetradecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(14-sulfotetradecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



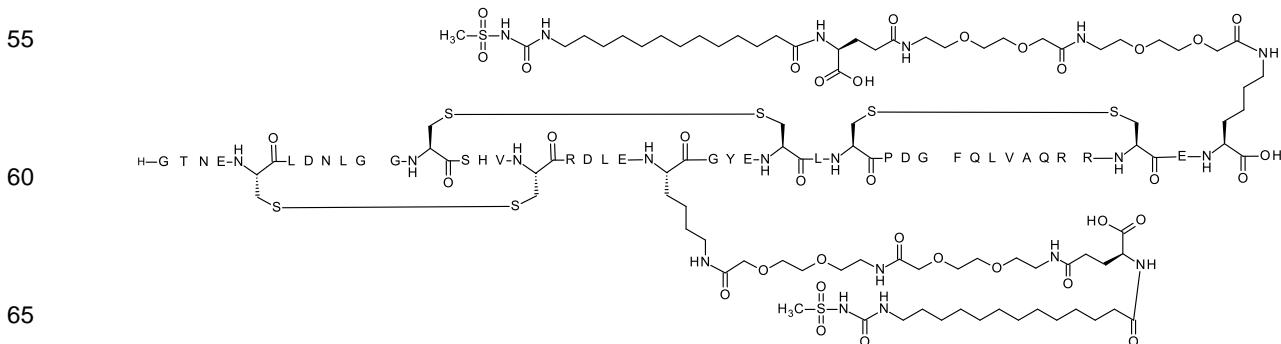
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

45 LCMS027: m/3 encontrada = 1992,6; m/4 encontrada = 1494,7; m/5 encontrada = 1196,0; masa calc. = 5974,8

Ejemplo 142

50 N{alfa}{N{épsilon}-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(metilsulfonilcarbamoilamino)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[13-(metilsulfonilcarbamoilamino)tridecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys



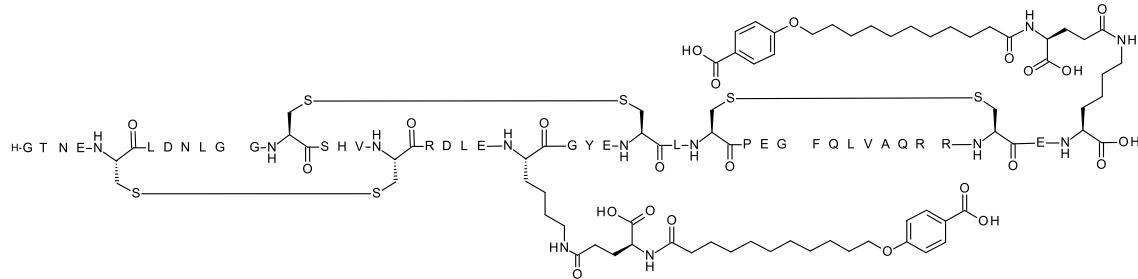
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

5 LCMS027: m/3 encontrada = 2020,7; m/4 encontrada = 1515,8; m/5 encontrada = 1212,8; masa calc. = 6058,8

Ejemplo 143

10 N{alpha}(N{épsilon}-313)-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}][(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]Lys



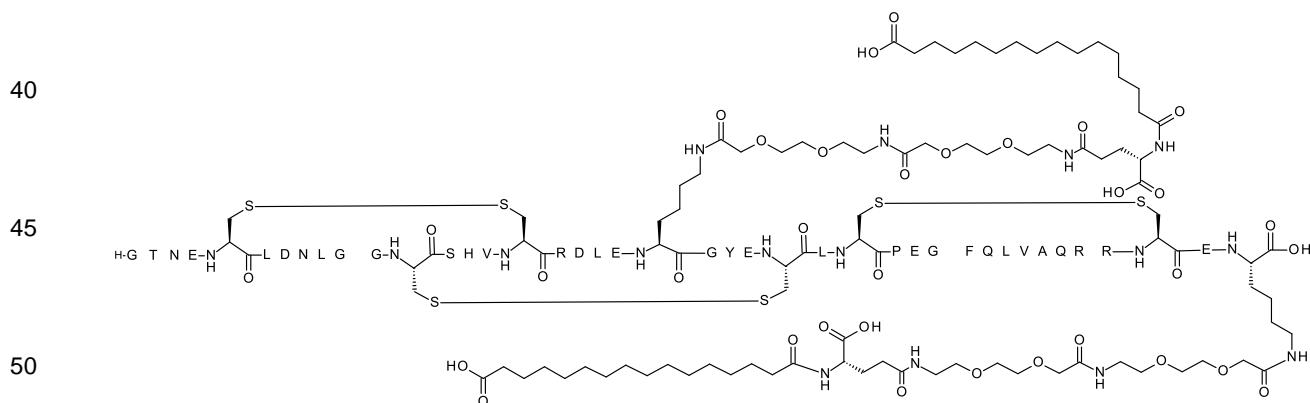
35 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/2 encontrada = 2719,0; m/3 encontrada = 1812,8; m/4 encontrada = 1359,8; masa calc. = 5436,1

30 Ejemplo 144

35 N{alpha}{N{épsilon}313}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



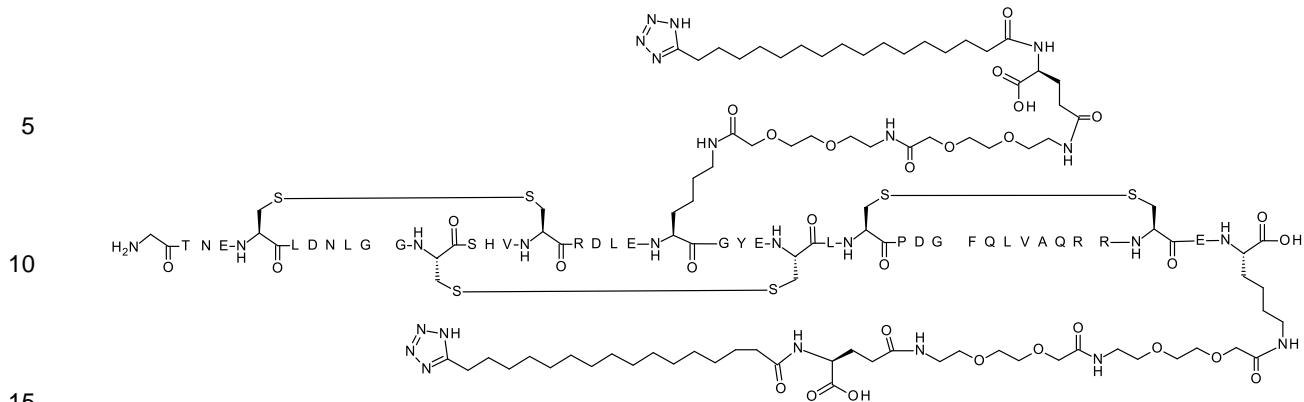
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98

55 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 1982.2; m/4 encontrada = 1486.9; m/5 encontrada = 1189.7; masa calc. = 5944.7

Ejemplo 145

N{alpha}(N{épsilon}-313)-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[16-(1H-tetrazol-5-
il)hexadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-
R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[16-(1H-tetrazol-5-
il)hexadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



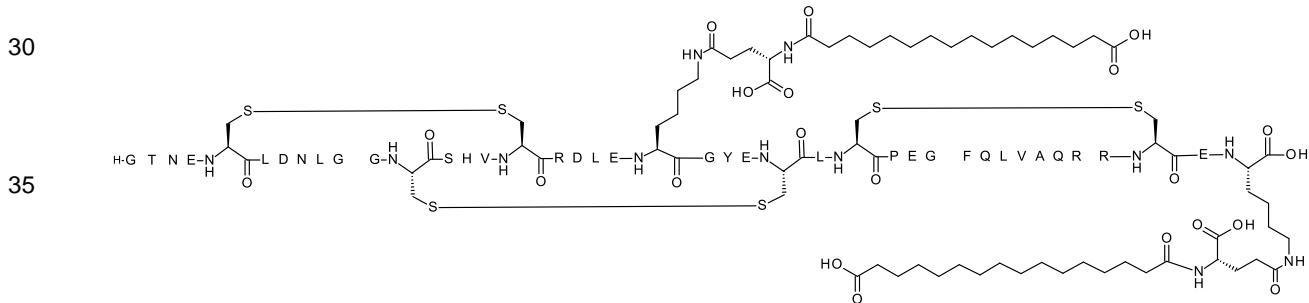
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS29: m/3 encontrada = 2003,3; m/4 encontrada = 1502,7; m/5 encontrada = 1202,2; masa calc. = 6006,8

Ejemplo 146

25 N{alpha}(N{epsilon}-313)-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}][(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]Lys



La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98

Compuesto preparado mediante el método general B

45 LCMS29: m/3 encontrada = 1788,8; m/4 encontrada = 1341,9; m/5 encontrada = 1073,7; masa calc. = 5364,1

Ejemplo 147

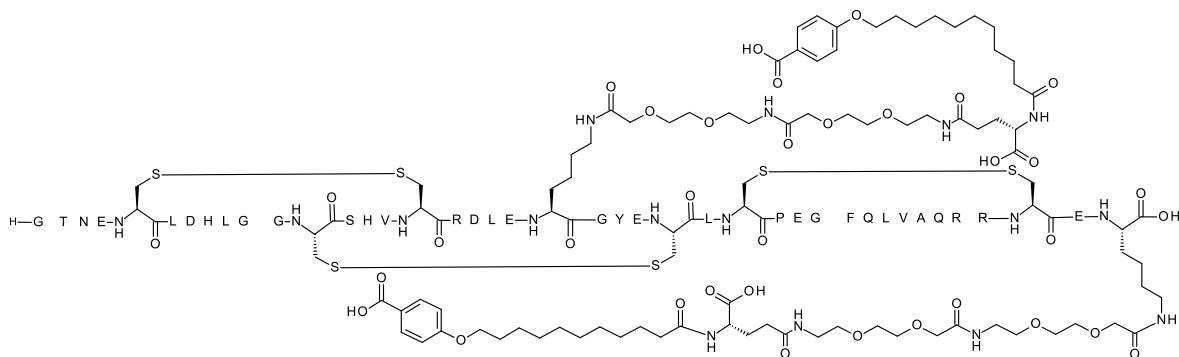
50 N{alpha}(N{épsilon}-313)-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-
carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxi)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

55

60

65

5



15 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 103

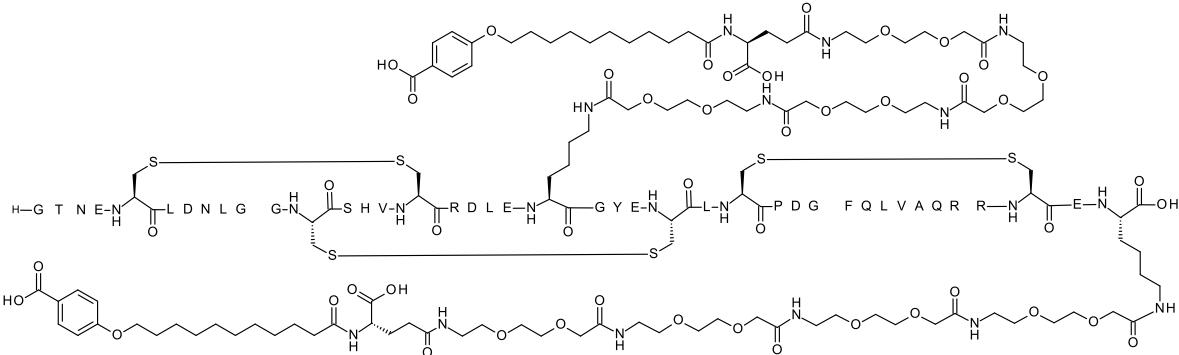
Compuesto preparado mediante el método general B

20 LCMS29: m/2 encontrada = 3020,8; m/3 encontrada = 2014,3; m/4 encontrada = 1510,9; masa calc. = 6039,8

Ejemplo 148

25 N{alfa}{N{épsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4S]-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4S]-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

30



45 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

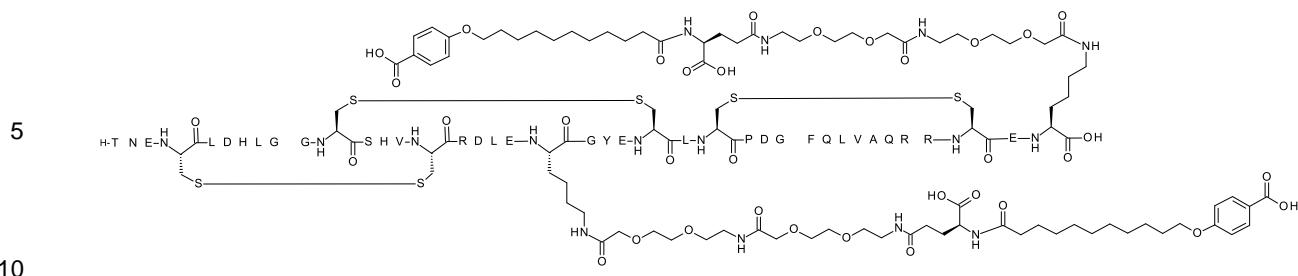
50 LCMS027: m/3 encontrada = 2195,5; m/4 encontrada = 1646,9; m/5 encontrada = 1317,7; masa calc. = 6583,3

Ejemplo 149

55 N{alfa}{N{épsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4S]-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]-[His300,Leu301,Arg309,Glu312,Lys313],des-Gly293-LDL-R-(294-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4S]-4-carboxi-4-[11-(4-carboxifenoxy)undecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]Lys

60

65



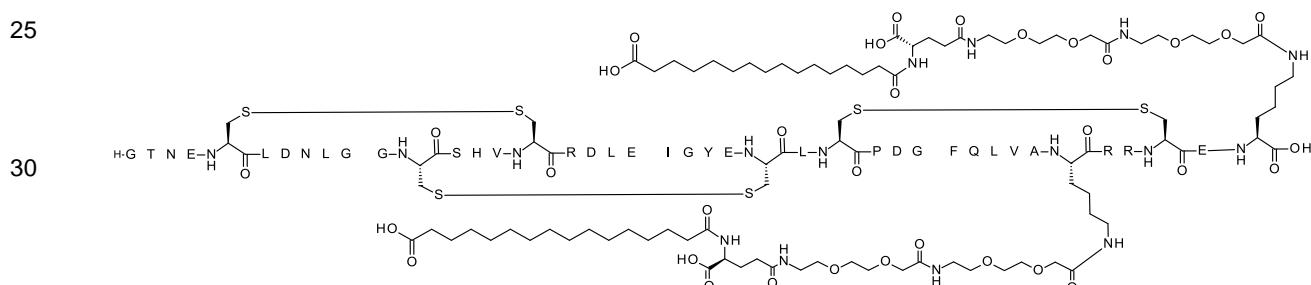
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 74

Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS027: m/3 encontrada = 1990,6; m/4 encontrada = 1493,2; m/5 encontrada = 1191,1; masa calc. = 5968,7

Ejemplo 150

20 N{alfa}{N{épsilon}-328}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15- carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [Leu301,Arg309,Glu312,Lys328]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15- carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



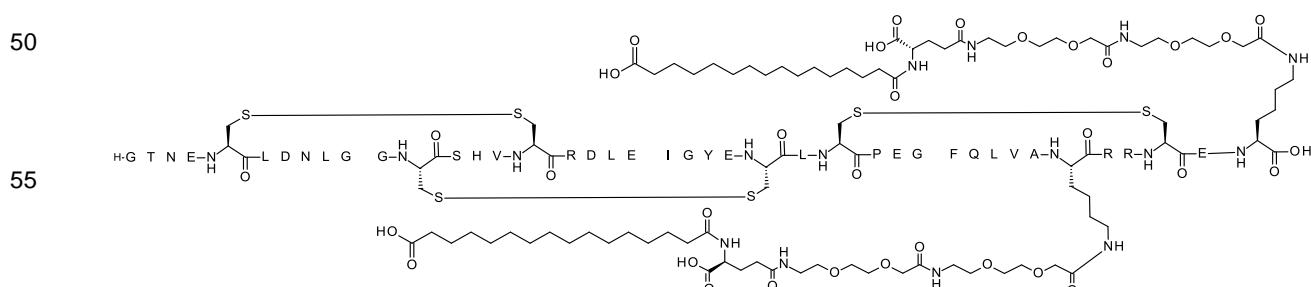
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 78

Compuesto preparado mediante el método general B

40 LCMS27: m/2 encontrada = 2958,7; m/3 encontrada = 1973,0; m/4 encontrada = 1480,0; masa calc. = 5915,7

Ejemplo 151

45 N{alfa}{N{épsilon}-328}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15- carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [Leu301,Arg309,Glu312,Glu321,Lys328]-LDL-R-(293-332)-peptidil}-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15- carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



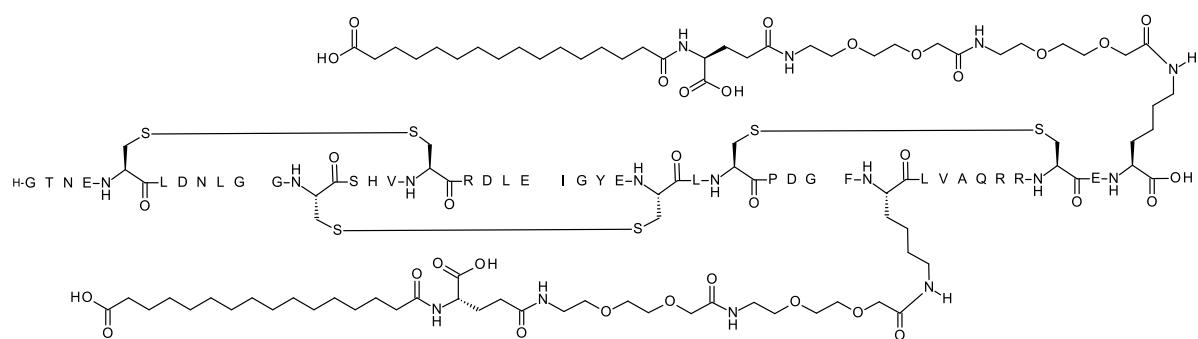
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 104

Compuesto preparado mediante el método general B

65 LCMS01: m/4 encontrada = 1483,2; m/5 encontrada = 1186,8; masa calc. = 5930,0

Ejemplo 152

5 N{alfa}(N{epsilon}-324)-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys324]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



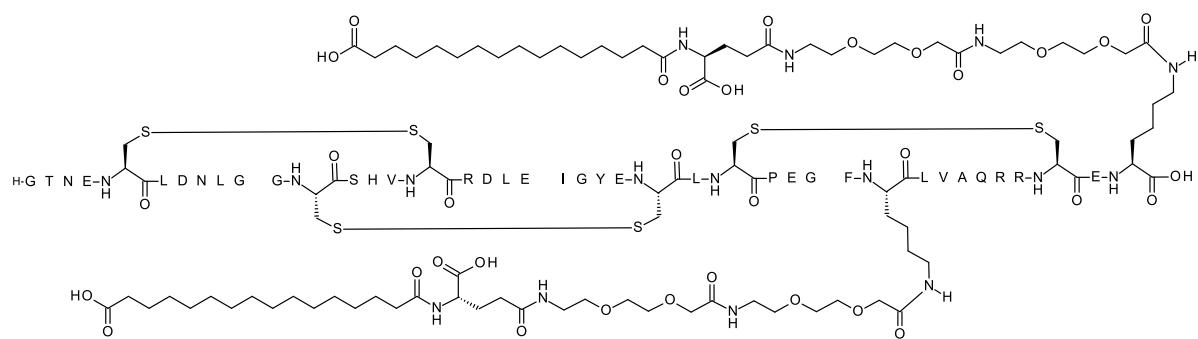
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 72

Compuesto preparado mediante el método general B

25 LCMS34: m/4 encontrada = 1974,6; m/5 encontrada = 1183,9; masa calc. = 5915,7

Ejemplo 153

30 N{alfa}(N{epsilon}-324)-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321,Lys324]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys



La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 105

50 Compuesto preparado mediante el método general B

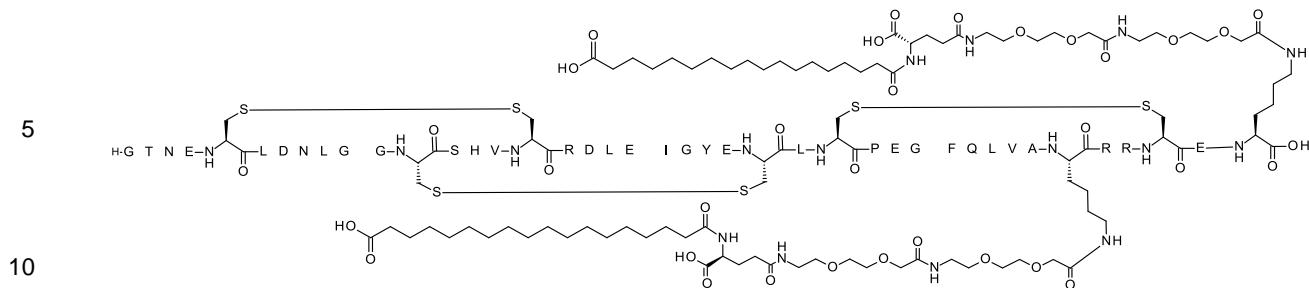
LCMS01: m/4 encontrada = 1483,3 m/5 encontrada = 1186,8 masa calc. = 5929,8

Ejemplo 154

55 N{alfa}(N{epsilon}-328)-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321,Lys328]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{epsilon}[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys

60

65



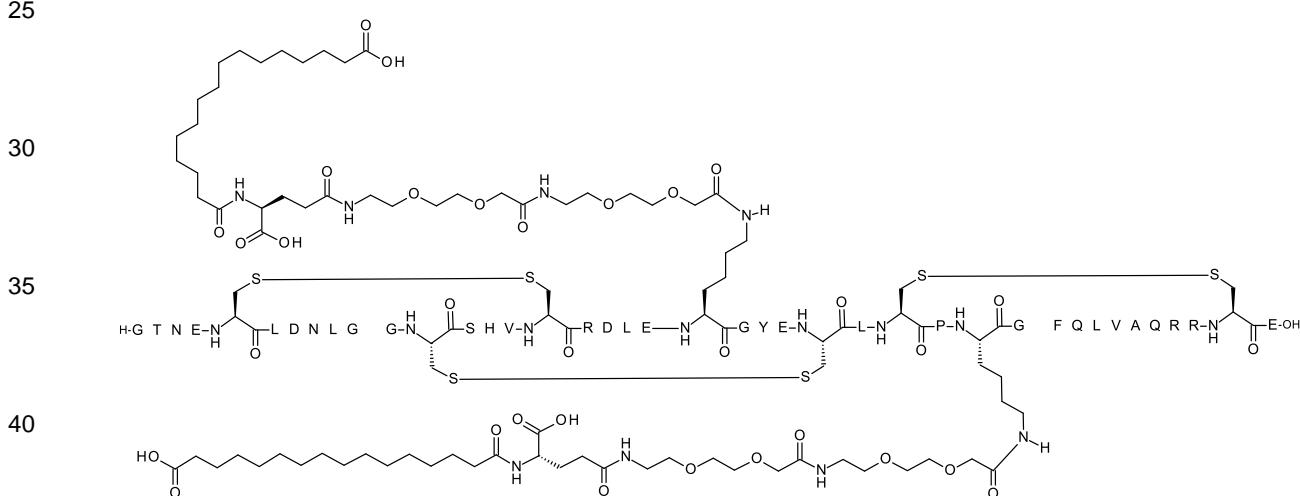
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 104

15 Compuesto preparado mediante el método general B

LCMS01: m/4 encontrada = 1497,3; m/5 encontrada = 1198,2; masa calc. = 5985,9

Ejemplo 155

20 N{épsilon-313}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-
carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil],N{épsilon-321}-[2-[2-[2-[2-[2-
[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-
[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Lys321]-LDL-R-(293-332)-péptido



45 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:72

Compuesto preparado mediante el método general B

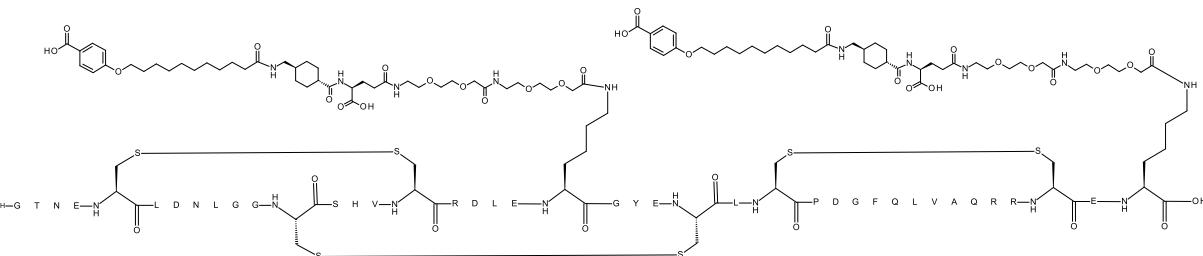
LCMS01: m/4 encontrada = 1454.7; m/5 encontrada = 1164.0 masa calc. = 5815.6

50 Example 15C

55 N{alfa}(N{épsilon}-313)-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[4-[[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]ac-
etyl]-[Leu301,Arg309,Glu312,Lys313]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[4-[[11-
(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]ac-
etyl]Lys

60

65



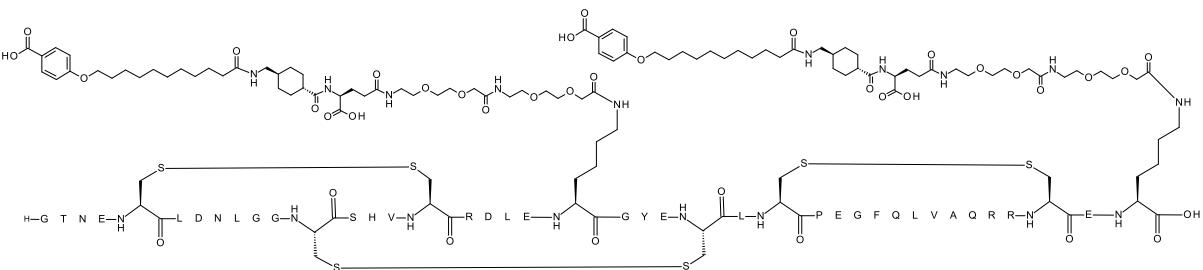
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32

Compuesto preparado mediante el método general B

15 LCMS27: m/3 encontrada = 2094,6; m/4 encontrada = 1571,2; masa calc. = 6281,1

Ejemplo 157

20 N{alfa}{N{épsilon}-313}-{2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[[4-[[11-(4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]amino]etoxi]etoxi]ac
25 etil}-{Leu301,Arg309,Glu312,Lys313,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-
carboxifenoxi)undecanoilamino]metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]ac
etyl]Lys



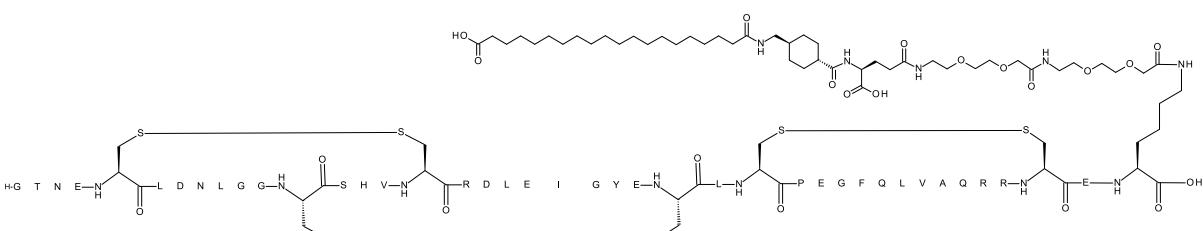
La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98

Compuesto preparado mediante el método general B

40 LCMS27: m/3 encontrada = 2099,3; m/4 encontrada = 1574,7; masa calc. = 6295,1

Ejemplo 158

45 N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[[4-
[(19-
carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]L
ys



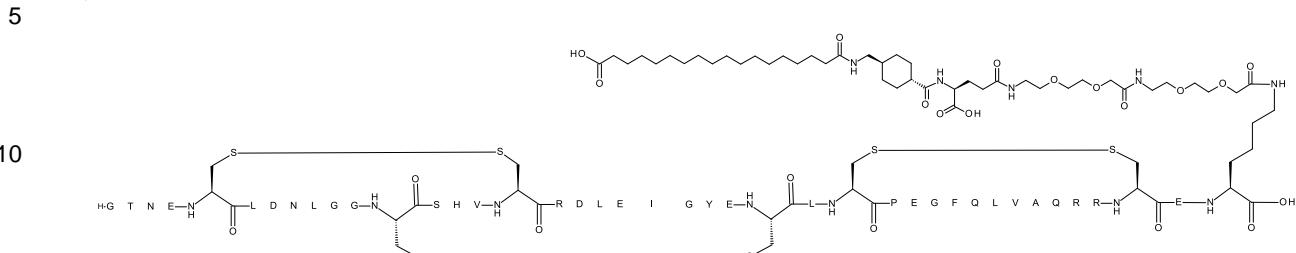
60 La cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 19

Compuesto preparado mediante el método general B

65 LCMS27: m/3 encontrada = 1813,2; m/4 encontrada = 1360,2; m/5 encontrada = 1088,3; masa calc. = 5437,2

Ejemplo 159

N{alfa}{[Leu301,Arg309,Glu312,Glu321]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[[4-[(17-
carboxiheptadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]acetil]
Lys



Compuesto preparado mediante el método general B

20 LCMS27: m/3 encontrada = 1803,9; m/4 encontrada = 1353,1; m/5 encontrada = 1082,7; masa calc. = 5409,2

Tabla 4. Tabla resumen de los compuestos de los Ejemplos 1-159

Ejemplo núm.	Modificaciones de la secuencia	Sustituyente	Sitios de unión
1	299A, 301L, 307I, 309R, 310K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -	N-terminal
2	301L, 309R	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -	N-terminal
3	301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
4	301L, 309R	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	312K
5	301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -	N-terminal
6	299K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	299K
7	301L, 309R, 312E, 330K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	330K
8	301L, 309R, 312E	HOS(O)2-(CH ₂) ₁₅ -CO-gGlu-2xADO-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -	N-terminal
9	301L, 309R, 312E, 330K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 330K
10	301L, 309R, 312E, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K
11	293K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	293K
12	293K, 301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	293K, 333K
13	293K, 301L, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	293K, 333K
14	301L, 309R, 312E, 332K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	332K, 333K
15	301L, 309R, 312E, 330K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	330K, 333K
16	301L, 309R, 312E, 321K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	321K, 333K
17	301L, 309R, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	312K, 333K
18	301L, 309R, 312E, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
19	301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal
20	301L, 309R, 312E, 321K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	321K
21	301L, 309R, 312E, 324K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	324K
22	301L, 309R, 312Q	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal
23	301L, 309R, 312E, 321E, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K
24	293K, 301L, 309R, 312E,	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	293K

	Ejemplo númer.	Modificaciones de la secuencia	Sustituyente	Sitios de unión
5		321E		
25	293K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 293K	
26	300K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	300K	
27	293K, 294K, 301L, 309R, 312E	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	293K, 294K	
10	28	293K, 301L, 309R	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	293K, 312K
29	301L, 309K, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	309K	
30	301L, 309R, 312E, 318K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	318K	
15	31	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
32	301L, 309R, 312E, 326K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	326K	
33	301L, 309R, 312E, 325K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	325K	
20	34	301L, 309R, 312E, 323K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	323K
35	35	301L, 309R, 312E, 322K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	322K
36	36	301L, 309R, 312E, 320K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	320K
25	37	301L, 309R, 312E, 329K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	329K
38	38	301L, 309R, 312E, 313K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	313K
39	39	301L, 309R, 312E, 328K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	328K
40	40	301L, 309R, 312E, 316K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	316K
30	41	301L, 309R, 312E, 315K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	315K
42	42	300H, 301L, 309R, 312R, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
35	43	301L, 309R, 312E, 314K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	314K
44	44	301L, 309R, 311K, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	311K
45	45	301L, 307K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	307K
46	46	301L, 309S, 312R, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
40	47	301L, 309S, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
48	48	299A, 301L, 307I, 309R, 310K		
49	49	301L, 309R		
50	50	301L, 309R, 312E		
45	51	301L, 306Y, 309S, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal
52	52	293N, 301L, 309S, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal
53	53	301L, 306K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	306K
50	54	301L, 305K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	305K
55	55	301L, 303K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	303K
56	56	301L, 302K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	302K
57	57	293N, 300H, 301L, 309R, 312R, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
58	58	301K, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	301K
59	59	298K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	298K
60	60	293N, 301L, 309R, 312R, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
61	61	301L, 307I, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K
62	62	301L, 306Y, 312E, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K
63	63	301L, 307I, 312E, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K
65	64	300H, 301L, 309R	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO-NH-CH2-	N-terminal

	Ejemplo núm.	Modificaciones de la secuencia	Sustituyente	Sitios de unión	
5			(C ₆ H ₄)-CH ₂ -		
65	300P, 301L, 307I, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal		
66	293N, 301L, 307I, 309R, 312D, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K		
67	293N, 301L, 309R, 312D, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K		
10	68	301L, 309R, 312E	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₅ -CO-NH-SO ₂ -(CH ₂) ₃ -CO-ADO-ADO-NH-CH ₂ -(C ₆ H ₄)-CH ₂ -	N-terminal	
15	69	301L, 309R, 312E, 328K, 329H	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	328K	
70	295D, 301L, 309R, 312E, 332K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	332K		
71	300H, 301L, 309R	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	312K		
72	300H, 301L, 307I, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal		
20	73	296K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	296K	
74	294K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	294K		
75	292K, 301L, 309R, 312E	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	292K		
25	76	des293, 294G, 301L, 309R, 312E, 328K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	328K	
77	301L, 306D, 309R, 312E, 324G, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K		
30	78	301L, 306D, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-3xADO y 4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 333K	
79	301L, 309R, 312E, 321K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-gGlu-2xADO	321K, 333K		
80	301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	333K		
35	81	301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₈ -CO-gGlu-2xADO	333K	
82	301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu	333K		
40	83	301L, 309R, 312E, 321K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₂ -CO-gGlu-2xADO	321K, 333K	
84	301L, 309R, 312E, 321K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	321K, 333K		
45	85	300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K	
86	301L, 309R, 312E, 313K, 328K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 328K		
50	87	301L, 309R, 312E, 313K, 324K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 324K	
88	301L, 309R, 312E, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 313K		
55	89	301L, 309R, 312E, 324K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	324K, 333K	
90	301L, 309R, 312E, 313K, 321K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 321K		
91	des293, 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K		
55	92	300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K	
93	292A, 301L, 309R, 312E, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 313K		
60	94	des293, 301L, 309R, 312E, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 313K	
95	des293, 301L, 309R, 312E, 313K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	313K		
65	96	301L, 309R, 312E, 313K, 332K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 332K	
97	301L, 309R, 312E, 328K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	328K, 333K		

	Ejemplo núm.	Modificaciones de la secuencia	Sustituyente	Sitios de unión
5	98	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu	313K, 333K
	99	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-2xgGlu	313K, 333K
	100	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-3xGly	313K, 333K
10	101	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-2xgGlu-2xADO	313K, 333K
	102	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	3-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
15	103	299A, 301L, 307I, 309R		
	104	301L, 309R, 310K		
20	105	301L		
	106	300H, 301L, 309R, 312E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	333K
25	107	301L, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 333K
	108	des293-294, 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
30	109	300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	3-HO-Isoxazol-(CH ₂) ₁₂ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
	110	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	3-HO-Isoxazol-(CH ₂) ₁₂ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
35	111	301L, 309K, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	309K, 333K
	112	301L, 306Y, 312E, 324K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	324K, 333K
40	113	300H, 301L, 309R, 312E, 314K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	314K, 333K
	114	294W, 301L, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 333K
45	115	301L, 309K, 312E, 328K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	309K, 328K
	116	301L, 309K, 312E, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	309K, 313K
50	117	des293, 301L, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 333K
	118	301L, 309R, 312E, 324K, 328K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	324K, 328K
55	119	292A, 301L, 309R, 312E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 333K
	120	301L, 306Y, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
60	121	301L, 309R, 312E, 332K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 332K
	122	301L, 309R, 312E, 328K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 328K
65	123	301L, 309R, 312E, 324K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 324K
	124	301L, 309K, 312E, 332K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	309K, 332K
70	125	301L, 309K, 312E, 324K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	309K, 324K
	126	301L, 309K, 312E	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	N-terminal, 309K
75	127	301L, 309R, 312E, 321K, 332K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	321K, 332K
	128	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
80	129	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu	313K, 333K
	130	300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 332K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 332K
85	131	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-TtdSuc	313K, 333K
	132	301L, 309R, 312E, 313K,	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-TtdSuc	313K, 332K

Ejemplo núm.	Modificaciones de la secuencia	Sustituyente	Sitios de unión
	321E, 332K		
5	133 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
10	134 301L, 309R, 312E, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₈ -CO-gGlu-2xADO	333K
15	135 301L, 309R, 312E, 313K, 314K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 314K
20	136 301L, 309R, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	312K, 313K
25	137 301L, 309R, 314K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	312K, 314K
30	138 301L, 309R, 311K, 312E, 313K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	311K, 313K
35	139 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₉ -CO	313K, 333K
40	140 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₂ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
45	141 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	HOS(O) ₂ -(CH ₂) ₁₃ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
50	142 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	MeS(O) ₂ NH(CO)NH-(CH ₂) ₁₂ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
55	143 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu	313K, 333K
	144 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
	145 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	Tetrazolil-(CH ₂) ₁₅ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
	146 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu	313K, 333K
	147 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
	148 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-4xADO	313K, 333K
	149 des293, 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-gGlu-2xADO	313K, 333K
	150 301L, 309R, 312E, 328K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	328K, 333K
	151 301L, 309R, 312E, 321E, 328K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	328K, 333K
	152 301L, 309R, 312E, 324K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	324K, 333K
	153 301L, 309R, 312E, 321E, 324K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	324K, 333K
	154 301L, 309R, 312E, 321E, 328K, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-gGlu-2xADO	328K, 333K
	155 301L, 309R, 312E, 313K, 321K	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -CO-gGlu-2xADO	313K, 321K
	156 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-Trx-gGlu-2xADO	313K, 333K
	157 301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	4-HOOC-(C ₆ H ₄)-O-(CH ₂) ₁₀ -CO-Trx-gGlu-2xADO	313K, 333K
	158 301L, 309R, 312E, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₈ -CO-Trx-gGlu-2xADO	333K
	159 301L, 309R, 312E, 321E, 333K	HOOC-(CH ₂) ₁₆ -CO-Trx-gGlu-2xADO	333K

60 D. Métodos generales para la caracterización

D.1.1 Competitivo de la unión de PCSK9-LDL-R (ELISA)

El objetivo de este ensayo es medir la afinidad de unión aparente de los compuestos del EGF(A) a PCSK9.

Debido a su capacidad para inhibir la interacción de PCSK9 con LDL-R, los compuestos de la invención pueden referirse, también, como inhibidores de PCSK9.

- 5 El día antes del experimento, el receptor humano recombinante de la lipoproteína de baja densidad (rhLDL-R; derivado de NSO; R & D Systems # 2148-LD) se disolvió a 1 µg/ml en carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6, y después se añadieron 100 µl de la solución a cada pocillo de las placas del ensayo (Maxisorp 96, NUNC # 439454) y se recubrieron durante toda la noche a 4 °C. En el día de los experimentos, se obtuvieron las curvas de concentración de 8 puntos de los compuestos del EGF(A) que contenían PCSK9 biotinilado (0,5 ug/ml, BioSite/BPSBioscience cat. núm. 71304) por duplicado. Las mezclas de los compuestos del EGF(A) y PCSK9 biotinilado se prepararon e 10 incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en el tampón del ensayo que contenía Hepes 25 mM, pH 7,2 (15630-056, 100 ml, 1M), NaCl 150 mM (Emsure 1.06404.1000) HSA al 1 % (Sigma A1887-25G) Tween 20 al 0,05 % (Calbiochem 655205) CaCl₂ 2 mM (Sigma 223506-500G). Las placas del ensayo que estaban recubiertas se lavaron después 4x en 200 µl de tampón del ensayo, y después se añadió 100 µl de la mezcla de los compuestos del EGF(A) y PCSK9 biotinilado a las placas y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4x 15 en 200 µl de tampón del ensayo y después se incubaron con estreptavidina-HRP (25 ng/ml; VWR # 14-30-00) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detecta mediante la adición de 50 µl de TMB-on (KEM-ENTEC) y se incuba 10 min en la oscuridad. Después, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₃PO₄ 4 M a la mezcla, añadido mediante pipeteo múltiple electrónico. Las placas se leyeron después en un Spectramax a 450 y 620 nm dentro de 1 hora. La lectura a 620 nm se usó para la sustracción del fondo. Los valores de IC₅₀ se 20 calcularon mediante el uso de Graphpad Prism, mediante regresión no lineal log(inhibidor) frente a la pendiente de respuesta-variable (cuatro parámetros), y se convirtieron en valores de Ki mediante el uso de la siguiente fórmula: Ki=IC₅₀/(1+(Biotina-PCSK9)/(kd(Biotina-PCSK9))), donde la Kd de la biotina-PCSK9 es 1,096727714 µg/ml y [Biotina-PCSK9] = 0,5 (µg/ml).
- 25 Los resultados se muestran en las Tablas 5.1-5.5 más abajo. Mayores valores de Ki reflejan menores afinidades de unión aparente para PCSK9 y viceversa. Debe señalarse que pocos de los compuestos muestran una Ki que es sustancialmente mayor que el valor medido para EGF66, tal como un valor más arriba de 500 nM, que indica que la unión observada no es específica. Las sustituciones de aminoácidos del péptido y/o la una o más derivaciones de 30 las cadenas laterales pueden contribuir a la pérdida de unión a LDL-R. En general, un gran número de los compuestos del EGF(A) probados muestran la capacidad para inhibir a PCSK9 en su unión al hLDL-R.

Péptidos inhibidores de PCSK9

- 35 Inicialmente un grupo de péptidos que incluyeron diversas sustituciones de aminoácidos se probaron como se describió en la sección D1.1 y los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 - Afinidad de unión aparente (Ki) para los péptidos de PCSK9

Ej. N.º	Variante del péptido	Ki (nM)
WT	-	-
48	299A, 301L, 307I, 309R, 310K	9,4
103	299A, 301L, 307I, 309R	0,9
104	301L, 309R, 310K	7,3
49	301L, 309R	1,2
105	301L	2,8
50	301L, 309R, 312E	1,1

- 40 El EGF66, identificado como la variante peptídica más potente en el documento WO 2012177741, tiene 5 mutaciones. Como se observó más arriba, los inventores del presente caso encontraron que varias de estas mutaciones no eran de gran importancia para el valor de EC₅₀ determinado en el ensayo descrito en D1.1. En particular los inventores encontraron que los compuestos que incluyen el residuo Asp (D) natural en la posición 310 tenían mayores potencias que los compuestos con 310K. También parece ser que la principal sustitución de aminoácidos es 301L preferentemente en combinación con 309R. Finalmente, 307I y 299A solo contribuyeron 45 modestamente a la afinidad de los péptidos.

Unión N-terminal del sustituyente

- 50 En un experimento subsecuente se probó si la unión de un prolongador de la semivida, por ejemplo, un sustituyente para los péptidos, influye en la EC₅₀ determinada mediante el ensayo descrito en D.1.1. Como se describió en la 55 presente descripción un sustituyente puede unirse mediante diferentes tecnologías y los inventores decidieron inicialmente aplicar la unión por medio de un átomo de nitrógeno mediante el uso del aminoácido N-terminal de los péptidos. Así fue como se describió en la sección B llevado a cabo mediante acilación (en solución o en resina) y alquilación.
- 60 Como se observa en la Tabla 5.2 todos los compuestos probados tienen un valor de Ki por debajo de 3,0 lo que sugiere que los diversos prolongadores y elementos enlazadores se toleran bien. Esto fue inusual ya que la 65

potencia, usualmente, está influida negativamente mediante la unión de una cadena lateral como se observó previamente para los péptidos similares a GLP-1.

5 Tabla 5.2 - K_i aparente para los péptidos de PCSK9 sustituidos en el N-terminal

Ej. Núm.	Variante del péptido	Unión	K_i (nM)
1.	299A, 301L, 307I, 309R, 310K	Alquilación	nd
2	301L, 309R	Alquilación	1,7
64	300H, 301L, 309R	Alquilación	0,7
5	301L, 309R, 312E	Alquilación	1,3
8	301L, 309R, 312E	Alquilación	1,2
19	301L, 309R, 312E	Acilación	1,7
68	301L, 309R, 312E	Alquilación	0,8
22	301L, 309R, 312Q	Acilación	2,6
51	301L, 306Y, 309S, 312E	Acilación	1,6
52	293N, 301L, 309S, 312E	Acilación	2,1
65	300P, 301L, 307I, 309R, 312E	Acilación	>1000
72	300H, 301L, 307I, 309R, 312E	Acilación	2,8

25 Unión a Lys del sustituyente

25 Para evaluar posiciones alternativas para el enlace de un sustituyente a un péptido inhibidor de PCSK9 se prepararon una serie de compuestos. Se usó un péptido de base que incluye tres sustituciones de aminoácidos; N301L, N309R y K312E excepto en los ejemplos 58, 29 y 4 en combinación con una sustitución de Lys en diversas posiciones. Todos los compuestos probados incluyeron los 6 aminoácidos de cisteína en las posiciones 297, 304, 308, 317, 319, 331 en que usualmente están acopladas en puentes disulfuro con cisteínas. 312E se incluyó para garantizar la sustitución específica del sitio excepto en el ejemplo 4 donde se obtiene la unión a 312K wt. La extensión del péptido con una Lys también se probó (Ejemplo 75 y 3). El mismo sustituyente como se describió anteriormente que incluye un prolongador diácido C18 y un enlazador gGlu-2xAdo se usó en todos los compuestos y se unió por medio de acilación. Los resultados se incluyen en la Tabla 5.3.

35 Tabla 5.3. - K_i aparente para derivados de PCSK con un sustituyente unido por medio de un residuo de Lys

Ej. Núm.	Variante del péptido	Sitio de unión	K_i (nM)
75	292K, 301L, 309R, 312E	292K	1,5
11	293K, 301L, 309R, 312E	293K	2,4
74	294K, 301L, 309R, 312E	294K	1,4
73	296K, 301L, 309R, 312E	296K	8,9
59	298K, 301L, 309R, 312E	298K	610,7
6	299K, 301L, 309R, 312E	299K	3,3
26	300K, 301L, 309R, 312E	300K	1,3
58	301L, 309R, 312E	301K	1000,0
56	301L, 302K, 309R, 312E	302K	1032,0
55	301L, 303K, 309R, 312E	303K	1,7
54	301L, 305K, 309R, 312E	305K	2,1
53	301L, 306K, 309R, 312E	306K	1,7
45	301L, 307K, 309R, 312E	307K	1000,0
29	301L, 309R, 312E	309K	0,8
44	301L, 309R, 311K, 312E	311K	1,0
4	301L, 309R	312K	1,2
38	301L, 309R, 312E, 313K	313K	0,8
43	301L, 309R, 312E, 314K	314K	0,9
41	301L, 309R, 312E, 315K	315K	3,0
40	301L, 309R, 312E, 316K	316K	1,6

Ej. Núm.	Variante del péptido	Sitio de unión	Ki (nM)
5	30	318K	2,0
	36	320K	5,5
	20	321K	2,0
	35	322K	1,5
10	34	323K	1,7
	21	324K	0,9
	33	325K	1,4
	32	326K	1,4
15	39	328K	0,9
	37	329K	1,0
	7	330K	1,4
	10	332K	1,1
20	3	333K	0,8

El análisis mostró que la mayoría de los péptidos inhibidores de PCSK9 mantienen la funcionalidad. Las excepciones fueron la sustitución de Lys y la derivación en cualquiera de las posiciones 298, 301, 302 y 307 que produjo péptidos no funcionales. También, se observó que la introducción de Lys y la sustitución en la posición 296, 299, 315 y 320K redujo la afinidad aparente.

Por lo tanto, los datos también confirman el resultado de la Tabla 5.1 que indica que la sustitución de aminoácidos de Asn(N) 301 por Leu (L) es esencial para la unión.

30 No se observaron datos para la introducción de Lys y la sustitución en la posición 295 y 310. Como se describió anteriormente se encontró anteriormente que el mantenimiento de Asp en 310 se prefirió sobre la sustitución de 310K. Como se observará más abajo también se encontró que la unión se anula por la introducción de Asp (D) en la posición 295 (Ej. 70).

35 En resumen se concluyó que los compuestos que no comprenden un sustituyente unido en ninguna de las posiciones 295, 298, 302, 307 y 310 o en ninguna de las posiciones 295, 296, 298, 299, 302, 307, 310, 315 y 320 del péptido para PCSK9 generalmente son funcionales. Se concluyó además que una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 295, 298, 302, y 310 generalmente no es atractiva. Como se observa en las Tablas 5.1 y 5.2 la mutación V307I, sin embargo, parece ser aceptable o incluso atractiva en combinación con 301Leu.

40 45 Se considera además que los péptidos con sustitución de aminoácidos en una de las posiciones 295, 296, 298, 302, 310 probablemente tengan una menor funcionalidad, mientras que las sustituciones en 299, 315 y 320 solamente parecen disminuir la funcionalidad ligeramente. Por otra parte esto sugiere, también, que puede existir un alto grado de flexibilidad para los residuos de aminoácidos restantes ya que la sustitución de Lys y la unión de una cadena lateral influirán en los péptidos tanto como la mayoría de las otras sustituciones de aminoácidos.

Inhibidores de PCSK9 con dos sustituyentes

50 55 Se preparó una serie de compuestos con dos sustituyentes. La sustitución doble puede obtenerse mediante acilación, alquilación o una combinación en el N-terminal o en los residuos de Lys (K). De nuevo el N-terminal puede ser un aminoácido 293G o un residuo de aminoácido variante tal como 292A, 293G, 293K y 294T (en casos donde se elimina 293G). Los compuestos se prepararon con diferentes sustituyentes, aunque los dos sustituyentes en los compuestos individuales son idénticos. La cadena principal usada en este estudio incluyó de nuevo la sustitución de aminoácidos N301L en combinación con N309R y diversas sustituciones en el N-terminal y/o de Lys según se necesite para obtener la acilación/alquilación específicas.

Tabla 5.4 - Ki aparente para los inhibidores de PCSK9 con sustitución doble

Ejemplo núm.	Variante 301L, 309R, +	Sitios de Unión	Ki (nM)
60	9	N-terminal, 330K	2,7
	12	293K, 333K	2,7
	13	293K, 333K	2,1
	14	332K, 333K	1,2
	15	330K, 333K	1,5

	Ejemplo núm.	Variante 301L, 309R, +	Sitios de Unión	Ki (nM)
5	16	312E, 321K, 333K	321K, 333K	1,1
	17	333K	312K, 333K	1,8
	25	293K, 312E	N-terminal, 293K	2,0
	27	293K, 294K, 312E	293K, 294K	0,9
	28	293K	293K, 312K	0,8
10	31	312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,5
	78	306D, 312E, 333K	N-terminal, 333K	2,3
	79	312E, 321K, 333K	321K, 333K	1,5
	83	312E, 321K, 333K	321K, 333K	1,5
	84	312E, 321K, 333K	321K, 333K	1,8
15	85	300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,9
	86	312E, 313K, 328K	313K, 328K	1,1
	87	312E, 313K, 324K	313K, 324K	1,0
	88	312E, 313K	N-terminal, 313K	1,2
	89	312E, 324K, 333K	324K, 333K	1,0
20	90	312E, 313K, 321K	313K, 321K	1,6
	91	des293, 300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,9
	92	300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,0
	93	292A, 312E, 313K	N-terminal (292A), 313K	1,2
	94	des293, 312E, 313K	N-terminal (294T), 313K	0,9
25	96	312E, 313K, 332K	313K, 332K	1,2
	97	312E, 328K, 333K	328K, 333K	1,2
	98	312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,9
	99	312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,3
	100	312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,4
30	101	312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,6
	102	312E, 313K, 333K	313K, 333K	0,8
	107	312E, 333K	N-terminal, 333K	2,6
	108	des293-294, 300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	3,8
	109	300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,0
35	110	312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,7
	113	300H, 312E, 314K, 333K	314K, 333K	1,6
	114	294W, 312E, 333K	N-terminal, 333K	3,1
	117	des293, 312E, 333K	N-terminal, 333K	2,5
	118	312E, 324K, 328K	324K, 328K	1,2
40	119	292A, 312E, 333K	N-terminal, 333K	2,1
	120	306Y, 312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,6
	121	312E, 332K	N-terminal, 332K	2,1
	122	312E, 328K	N-terminal, 328K	2,2
	123	312E, 324K	N-terminal, 324K	2,0
45	127	312E, 321K, 332K	321K, 332K	2,4
	128	312E, 313K, 333K	313K, 333K	1,0
	129	312E, 313K, 333K	313K, 333K	2,6
	130.	300H, 312E, 313K, 332K	313K, 332K	1,8
	131.	312E, 313K, 333K	313K, 333K	2,6
50	132.	312E, 313K, 321E, 332K	313K, 332K	1,9
	133.	301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K	1,6

Ejemplo núm.	Variante 301L, 309R, +	Sitios de Unión	Ki (nM)
5	134.	312E, 321E, 333K	333K
	135.	312E, 313K, 314K	313K, 314K
	136.	313K	312K, 313K
	137.	314K	312K, 314K
	138.	311K, 312E, 313K	311K, 313K
10	139.	300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K
	140.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
	141.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
	142.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
	143.	312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K
15	144.	312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K
	145.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
	146.	312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K
	147.	300H, 312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K
	148.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
20	149.	des293, 300H, 312E, 313K, 333K	313K, 333K
	150.	312E, 328K, 333K	328K, 333K
	151.	312E, 321E, 328K, 333K	328K, 333K
	152.	312E, 324K, 333K	324K, 333K
	153.	312E, 321E, 324K, 333K	324K, 333K
25	154.	312E, 321E, 328K, 333K	328K, 333K
	155.	312E, 313K, 321K	313K, 321K
	156.	312E, 313K, 333K	313K, 333K
	157.	312E, 313K, 321E, 333K	313K, 333K
	Ejemplo núm.	Variante 301L +	Sitios de unión
30	111	309K, 312E, 333K	309K, 333K
	112	306Y, 312E, 324K, 333K	324K, 333K
	115	309K, 312E, 328K	309K, 328K
	116	309K, 312E, 313K	309K, 313K
	124	309K, 312E, 332K	309K, 332K
35	125	309K, 312E, 324K	309K, 324K
	126	309K, 312E	N-terminal, 309K
			2,8

De nuevo los inventores concluyeron que los sustituyentes son muy bien tolerados en una variedad de posiciones y combinaciones.

50 Derivados inhibidores de PCSK9 adicionales

Para explorar adicionalmente el papel de diversas sustituciones de aminoácidos en los péptidos de PCSK9 se prepararon compuestos adicionales y se probaron como se muestra en la Tabla 5.5. Todos los compuestos incluyen un sustituyente que se une por medio de un residuo de Lys introducido mediante sustitución de aminoácidos o extensión con 333K. Todas las cadenas principales de los péptidos incluyen la sustitución de aminoácidos N301L y opcionalmente una o más de N309R e I312E. Todos los sustituyentes incluyen un diácido graso que comprende 16-20 átomos de carbono y un enlazador que es gGlu solamente o extendido con Ado-Ado y/o un resto de ácido tranexámico (Trx).

60 Tabla 5.5 – Ki aparente para derivados de PCSK9 adicionales.

Ejemplo núm.	Variante 301L, 309R, 312E +	Sitios de unión	Ki (nM)
65	18	321E, 333K	333K
	23	321E, 332K	332K
	24	293K, 321E	293K
			1,8

5	69	328K, 329H	328K	1,3
10	70	295D, 332K	332K	1325
15	76	des293, 294G, 328K	328K	1,3
20	77	306D, 324G, 333K	333K	2,2
25	80	333K	333K	1,9
30	81	333K	333K	1,4
35	82	333K	333K	1,9
40	106	300H, 333K	333K	1,0
45	134	321E, 333K	333K	1,9
50	158	321E, 333K	333K	2,3
55	159	321E, 333K	333K	1,9
60	Ejemplo núm.	Variante 301L, 309R, +	Sitio de unión	Ki
65	22	312Q	N-term	2,6
70	42	300H, 312R, 333K	333K	0,7
75	57	293N, 300H, 312R, 333K	333K	0,5
80	60	293N, 312R, 333K	333K	1,0
85	66	293N, 307I, 312D, 333K	333K	2,1
90	67	293N, 312D, 333K	333K	2,0
95	71	300H	312K	0,9
100	Ejemplo núm.	Variante 301L, 312E, +	Sitio de unión	Ki
105	47	309S, 333K	333K	2,7
110	62	306Y, 332K	332K	0,6
115	63	307I, 332K	332K	1,4
120	Ejemplo núm.	Variante 301L, +	Sitio de unión	Ki
125	46	309S, 312R, 333K	333K	1,3
130	61	307I, 332K	332K	0,7

Los resultados en la Tabla 5.5, mencionados más arriba, muestran que la lisina wt interna en la posición 312 puede sustituirse con Glu (E) así como también Gln (Q), Arg (R) o Asp (D). Basados en esta variación se contempla que un amplio intervalo de residuos de aminoácidos serán tolerados en la posición 312 sin interferir con la función inhibitoria del péptido.

Otras varias sustituciones de aminoácidos también demostraron ser bien toleradas, lo que incluye a G293N, T294G, D299A, N300H, H306Y, H306D, N309S, Q324G y R329H, mientras que, como se mencionó anteriormente, N295D y N300P no son sustituciones de aminoácidos atractivas.

D.1.2 Ensayo de captación de LDL en células HepG2

Un ensayo alternativo para determinar la potencia inhibitoria de los péptidos de PCSK9 y los derivados de los mismos mediante la medición de la captación de LDL en células HepG2 se describe aquí más abajo.

Principio del ensayo: La captación de LDL está mediada principalmente por los hLDLR expresados endógenamente, y por lo tanto la capacidad de captación de LDL es una medida indirecta de la expresión de LDLR. Los hLDLR pueden ser regulados negativamente mediante incubación con PCSK9 exógeno en una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto la incubación con PCSK9 disminuirá la capacidad de las células para captar las moléculas de LDL. Esta regulación negativa de la captación de LDL puede antagonizarse después mediante la adición de compuestos que neutralizan o inhiben la unión a PCSK9/LDLR. En consecuencia, los inhibidores de PCSK9 pueden caracterizarse basado en su capacidad para aumentar la captación de LDL en presencia de PCSK9 y por ejemplo contrarrestar la regulación negativa de hLDLR mediada por PCSK9.

El ensayo se realiza mediante el uso de células HepG2 (Sigma Aldrich ECACC: núm. de acc. 85011430) cultivadas en suero fetal bovino deficiente de lipoproteína al 10 % (Sigma Aldrich #S5394) y se mide la capacidad de las células para captar partículas LDL marcadas de manera fluorescente BODIPY (Life technologies Europe BV #L3483).

Protocolo del ensayo: Las placas de 96 pocillos (Perkin Elmer, ViewPlate-96 Black #60005182) se recubrieron con Poli-D-Lisina (10 mg/l, Sigma Aldrich #P6407 disuelta en PBS Gibco #14190-094) durante 1 hora a 37 °C en incubadora. Después, las placas se lavaron 2 x en 100 µl de PBS (Gibco #14190-094). Se prepararon las composiciones de prueba para las curvas de concentración de 8 puntos de los compuestos del EGF(A), todas las cuales contenían PCSK9 (10 ug/ml) diluido en medio del ensayo (DMEM (Gibco #31966-021), suero fetal bovino deficiente en lipoproteína al 10 % (Sigma Aldrich #S5394) y 1 % Pen Strep (Cambrex #DE17-602E)), y se añadieron a las placas en un volumen de 50ul/pocillo.

Después de 30-60 minutos, 50 000 células HepG2 (Sigma-Aldrich: ECACC: núm. Atcc. 85011430 lote: 13B023), diluidas en medio del ensayo se añadieron en un volumen de 50 µl/pocillo, y las placas se incubaron 20 horas (a 37° C, CO2 al 5 %) en bolsas de plástico permeables al CO2 (Antalis Team, LDPE bolsa 120/35x300x0,025 mm #281604). Después de eso, las placas se vaciaron e inmediatamente se añadieron 50 µl de FL-LDL (Life technologies Europe BV #L3483) en una concentración de 10 µg/ml en medio del ensayo a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 horas (a 37° C, CO2 al 5 %) en bolsas de plástico permeables al CO2 mediante el uso de una cubierta negra sobre la tapa para proteger de la luz. Las placas se vaciaron y se lavó 2 veces con 100 µl de PBS (Gibco #14190-094). Después se añadieron 100 µl de PBS (Gibco #14190-094) y dentro de los 15 min después de eso, las placas se leyeron (lectura del fondo) mediante el uso de los siguientes filtros Ex (515 nm)/Em (520 nm) en un SpecktraMax M4 (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies).

Finalmente, se calcularon los valores de EC50 mediante el uso de GraphPad Prism, ajuste de la curva de regresión no lineal, dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable).

Los resultados se muestran en la Tabla 6, más abajo. Valores de EC50 menores reflejan mayor capacidad para invertir la regulación negativa de la captación de LDL mediada por PCSK9, y por el contrario un alto valor de EC50 es indicativo de un compuesto con baja capacidad para inhibir la regulación negativa de la captación de LDL mediada por PCSK9.

Como puede observarse la mayoría de los compuestos presentan una EC50 en el ensayo de captación de LDL de 100-500 nM que es indicativo de compuestos con una alta capacidad para invertir la regulación negativa de la captación de LDL mediada por PCSK9.

Tabla 6 Datos de la captación de LDL en células HepG2 (EC₅₀)

Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)	Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)	Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)
1.	ND	55.	ND	109.	572
2.	255	56.	ND	110.	465
3.	168	57.	438	111.	316
4.	302	58.	ND	112.	539
5.	220	59.	ND	113.	1383
6.	413	60.	261	114.	739
7.	304	61.	347	115.	247
8.	130	62.	411	116.	330
9.	ND	63.	197	117.	316
10.	199	64.	590	118.	191
11.	401	65.	10 000	119.	327
12.	ND	66.	248	120.	300
13.	280	67.	384	121.	201
14.	161	68.	124	122.	241
15.	211	69.	311	123.	351
16.	144	70.	ND	124.	264
17.	199	71.	217	125.	334
18.	172	72.	222	126.	489
19.	206	73.	ND	127.	245
20.	198	74.	123	128.	351
21.	174	75.	239	129.	892
22.	357	76.	272	130.	259
23.	143	77.	2044	131.	218

Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)	Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)	Ejemplo núm.	Captación de LDL EC ₅₀ (nM)
24.	160	78.	546	132.	195
25.	ND	79.	ND	133.	220
26.	358	80.	248	134.	180
27.	ND	81.	617	135.	1505
28.	ND	82.	203	136.	455
29.	163	83.	165	137.	2070
30.	182	84.	337	138.	480
31.	170	85.	157	139.	546
32.	224	86.	248	140.	226
33.	245	87.	185	141.	210
34.	232	88.	298	142.	126
35.	252	89.	139	143.	299
36.	ND	90.	380	144.	484
37.	188	91.	114	145.	329
38.	149	92.	147	146.	718
39.	156	93.	267	147.	246
40.	231	94.	375	148.	204
41.	ND	95.	257	149.	233
42.	324	96.	261	150.	ND
43.	499	97.	138	151.	ND
44.	237	98.	203	152.	ND
45.	ND	99.	167	153.	ND
46.	ND	100.	174	154.	148
47.	1102	101.	129	155.	391
48.	1278	102.	112	156.	167
49.	398	103.	ND	157.	ND
50.	164	104.	ND	158.	303
51.	ND	105.	ND	159.	178
52.	ND	106.	195		
53.	ND	107.	486		
54.	526	108.	2555		

D.2. PK en ratones

El objetivo de este estudio fue medir el perfil PK de los inhibidores de PCSK9 como se identificó más arriba.

Método:

Se usaron ratones C57bl/J hembras de Taconic (Ry, Dinamarca).

Dosificación del compuesto: Los compuestos se dosificaron por vía subcutánea (s.c., 500 nmol/kg) o intravenosa (i.v., 250 nmol/kg) en un volumen de 5 μ l por gramo de peso corporal.

Muestreo de sangre: Se tomaron muestras de sangre a los 2 min, 15 min, 30 min, 60 min, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 18 horas, 24 horas, 30 horas y 48 horas. La sangre (200 μ l) se extrajo de la vena sublingual y se transfirió a tubos recubiertos con EDTA (Microvette® VetMed 200 K3E, Sarstedt nr 09.1293.100). El plasma se aisló y se usó para la cuantificación de los péptidos anti-PCSK9.

Cuantificación: Las muestras de plasma se usaron para la cuantificación de los inhibidores de PCSK9 mediante el uso de LC-MS.

Muestreo y análisis:

El plasma se pipeteó hacia tubos Micronic sobre hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta su análisis de la concentración plasmática de los inhibidores de PCSK9 respectivos mediante el uso de LC-MS. En las muestras de plasma (que incluyen muestras para una curva estándar y QC, usadas para la cuantificación de desconocidos, y preparadas a partir de plasma estándar con adición de inhibidores de PCSK9 a un intervalo de concentración de 0,5-1000 nM) se precipitaron las proteínas mediante el uso de tres volúmenes de metanol al 100 % o acetonitrilo con ácido fórmico al 1 % (en dependencia del péptido anti-PCSK9) y se centrifugaron (16 000 x g, 4°C, 20 min). Los sobrenadantes se inyectaron en el sistema cromatográfico (TurboFlow Transcend 1250 & 10 válvula VIM, Thermo Fisher Scientific) que consistió en una columna de purificación Turboflow Cyclone inicial 0,5 x 50 mm (Thermo Fisher Scientific) y un péptido Aeris de elución 3,6 μm XB - columna C18 2,1 x 50 mm (Phenomenex) mantenida a 60 °C. El péptido anti-PCSK9 se eluyó mediante el uso de un gradiente cromatográfico con fase móvil que consistió en mezclas de agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % o 1 % (en dependencia de análogo o derivado del EGF(A)). El péptido anti-PCSK9 se detectó y cuantificó después de la infusión en línea del flujo LC al espectrómetro de masas LTQ Orbitrap o el Q Exactive (Thermo Fischer Scientific) equipado con una interfase de electropulverización que operó en modo positivo, ESI+.

Cálculo de las propiedades PK:

Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental mediante el uso del programa informático Phoenix WinNonlin 6.4. Los cálculos tanto para los datos de I.V. como para los de S.C. se realizaron mediante el uso de la Interpolación lineal trapezoidal lineal, con la ponderación $1/Y^2Y$. La biodisponibilidad se calculó mediante la división del AUC/Dosis para el perfil de S.C. con el AUC/Dosis para el perfil de I.V.

Resultados:

Los resultados se muestran en la Tabla 7. En la Tabla 7, $T_{\text{máx}}$ indica el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima del análogo o derivado del EGF(A) probado. $T_{1/2}$ es la semivida del análogo o derivado del EGF(A). MRT es tiempo de residencia medio. F (s.c.) es la biodisponibilidad del análogo o derivado del EGF(A) después de una inyección subcutánea. Mayores valores de $T_{1/2}$ reflejan una semivida más larga del compuesto probado.

Los resultados muestran que los inhibidores de PCSK9 de la invención, en particular los análogos del LDL-R(293-332) sustituidos con un sustituyente de ácido graso muestran semividas prolongadas.

Tabla 7 Propiedades farmacocinéticas de los análogos y derivados del LDL-R(293-332) en ratones

	Sustituyente	$T_{\text{máx}}$ (horas)	i.v. $T_{1/2}$ (horas)	s.c. $T_{1/2}$ (horas)	MRT (horas)	F (s.c.) (%)
Ejemplo 1	Sí (N-terminal)	2	16	12	15	99
Ejemplo 48	No	0,3	0,2	0,4	0,2	76
Ejemplo 2	Sí (N-terminal)	2	14	14	19	100
Ejemplo 3	Sí (por medio de 333K)	4	14	14	19	87
Ejemplo 5	Sí (N-terminal)	4	13	17	17	94
Ejemplo 6	Sí (por medio de 299K)	6	11	11	16	100
Ejemplo 13	Sí (por medio de 293K y 333K)	2	6	7,5	11	96
Ejemplo 19	Sí (N-terminal)	2	13	14	18	100
Ejemplo 4	Sí (por medio de 312K)	8	14,3	12,8	20,3	54

D.3. Modelo de desafío con hPCSK9

El objetivo de este estudio fue demostrar el cambio en el nivel de expresión del receptor de LDL en el hígado de ratones en respuesta a la inhibición de la acción de hPCSK9 inyectado por vía intravenosa con un péptido anti-PCSK9.

Método

Los ratones BalBC o NMRI machos saludables (Charles River, Alemania) se inyectaron con un péptido anti-PCSK9, ya sea s.c. o i.v., 15-120 minutos antes de inyectar hPCSK9 (Sino Biologicals, China) por vía intravenosa en la vena de la cola a una dosis de 0,4 mg/kg. Sesenta minutos después de la inyección de hPCSK9, los animales se anestesian con isoflurano y se someten a eutanasia mediante dislocación cervical. Despues el hígado se escinde

rápidamente y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. Los hígados se mantuvieron a -80 grados Celsius hasta su análisis.

5 Inmunoelectrotransferencia para LDL-R:

Las muestras de tejido del hígado (100 mg) se homogeneizaron en 500 μ l de tampón de lisis (Life Technology, FNN0011) que contenía un cóctel de inhibidores de fosfatasas; PhosStop (Roche, 04 906 837 001) y un cóctel de inhibidores de proteasas; compelate (Roche, 04 693 159 001). Después de añadir 1 perla de acero los tejidos se homogenizaron durante 2,5 min a 30 Hz. Después de la centrifugación a 5000 xg durante 5 min, se determinó el contenido de proteínas totales mediante el uso del conjunto de ensayo de proteínas BCA (Pierce, 23225). Igualas cantidades de proteínas (60 μ g) en el tampón de muestras (Life Technology, NP0007) se hirvieron durante 10 min y se centrifugaron durante 2 min a 14 000 rpm antes de cargarlas en geles de Tris-acetato 3-8 % Criterion XT (BioRad#345-0131) y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (pilas regulares iBlot 2 NC, novex # IB23001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technology). Se confirmó que la transferencia de proteínas era igual mediante la tinción con Ponceau S (Sigma, P7170) de las membranas y éstas se bloquearon además en tampón de bloqueo (TBS-T, Tween al 2 %). Las proteínas LDL-r se detectaron con un anticuerpo primario anti LDLr de conejo (Cayman Chemical Company #10012422), mientras que las proteínas beta-actina se detectaron mediante el uso de un anticuerpo primario anti beta-actina de conejo (abcam # ab6276). Ambas proteínas se visualizaron además con anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa (Biorad #170-6516) mediante el uso el quimioluminiscente WesternBright Quantum (Advansta # K-12042-D10) y se obtuvieron imágenes mediante el uso de una cámara CCD (LAS3000, FujiFilm). El análisis cuantitativo de las señales quimioluminiscentes de las inmunoelectrotransferencias se realizó con el programa informático MultiGauge (Fujifilm).

25 Resultados

La figura 1 muestra los niveles de expresión hepática del LDL-R medidos por inmunoelectrotransferencia, presentados como gráfico de dispersión para los animales individuales, n=3-6. "Vehículo-vehículo" es el grupo de controles sanos (nivel del valor inicial), "vehículo-hPCSK9" es el grupo inyectado con hPCSK9 solo.

30 Los resultados muestran que hPCSK9 disminuye el nivel de expresión del LDL-R y este efecto es inhibido por los inhibidores de PCSK9 probados.

35 En la Tabla 8, se presentan los datos como el porcentaje de cambio en relación con la ventana entre el nivel del valor inicial en los animales controles sanos (ajustado a 100 %) y el nivel después de la regulación negativa por hPCSK9 solo (ajustado a 0 %).

40 Los 6 ejemplos probados son capaces de inhibir la acción de hPCSK9 sobre el nivel de expresión del LDL-R y el nivel de inhibición observado es similar al nivel de inhibición observado mediante el uso de la molécula de control Alirocumab.

45 Tabla 8:

Grupo/Ejemplo	Porcentaje de valores iniciales (%)	Dosis del inhibidor (nmol/kg)
Vehículo-Vehículo	100	0
Vehículo-hPCSK9	0	0
Ejemplo 2-hPCSK9	110	300
Ejemplo 3-hPCSK9	113	300
Ejemplo 5-hPCSK9	123	300
Ejemplo 6-hPCSK9	96	300
Ejemplo 13-hPCSK9	175	300
Ejemplo 19-hPCSK9	190	300
Alirocumab-hPCSK9	157	22

50 Conclusión

55 Varios ejemplos de compuestos han mostrado eficacia en la inhibición de la regulación negativa de los niveles de expresión del LDL-R mediante hPCSK9.

56 D.4. Reducción del LDL-colesterol en hámsteres

60 El objetivo del estudio fue evaluar los efectos de los inhibidores de PCSK9 sobre el LDL-C en los hámsteres sirio dorado alimentados con una dieta de pienso estándar.

65 Método

66

En el estudio se usaron hámsteres sirios dorados machos (Janvier Elevage, Saint Isle, Francia), de 6 semanas de edad (91-100 g). Después de 1 semana de adaptación, los hámsteres en ayunas por 4 horas (el ayuno inició a ~08:00 am) se pesaron y se tomaron muestras de sangre (100 µl/EDTA) mediante sangrado retrorbillar bajo anestesia con isoflurano alrededor del mediodía para medir el colesterol total, LDL-colesterol y HDL-colesterol. Los hámsteres se distribuyeron al azar en 5 grupos homogéneos (n=10/grupo) de acuerdo con sus niveles de 1) LDL-colesterol, 2) HDL-colesterol y 3) colesterol total. Después de la aleatorización, los hámsteres se trataron mediante inyección subcutánea una vez al día durante 5 días. El peso corporal se midió diariamente durante el periodo de tratamiento.

10 A los 3 días del tratamiento, los hámsteres en ayunas durante 4 horas se pesaron y se tomaron muestras de sangre (100 µl/EDTA) mediante sangrado retrorbillar bajo anestesia con isoflurano a ~1 hora después de las dosis de la mañana (alrededor del mediodía) para medir el colesterol total, LDL-colesterol y HDL-colesterol.

15 A los 5 días de tratamiento, los hámsteres en ayunas durante 4 horas se pesaron y se tomaron muestras de sangre (volumen máximo de sangre/EDTA) mediante sangrado retrorbillar bajo anestesia con isoflurano a ~1 hora después de las dosis de la mañana (alrededor del mediodía).

20 El plasma se aisló inmediatamente. Para cada individuo, se mantuvo ~15 µl de volumen de plasma para medir el colesterol total, LDL-colesterol y HDL-colesterol. Otro volumen de plasma (~50 µl) de cada individuo se usó después para hacer una mezcla de plasma por cada grupo de tratamiento (es decir 1 mezcla de ~500 µl por grupo, 5 mezclas) para el perfil de colesterol total por FPLC. Los hámsteres se sacrificaron después bajo anestesia con isoflurano mediante dislocación cervical y exanguinación. El hígado se cosechó, se pesó y 2 muestras de hígado (~50 mg y ~100 mg, peso no registrado) se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80 °C.

25 25 Las muestras de ~50 mg se usaron para evaluar la expresión proteica del receptor LDL hepático y de la pan-cadherina (control de carga) mediante inmunoelectrotransferencia y análisis de densitometría (programa informático Image J). Los datos se presentan como media +/- SEM. Para el análisis estadístico se usó un ANOVA de 1 vía o de 2 vías con posprueba de Dunnett o de Bonferroni, respectivamente. Una p<0,05 se consideró significativa.

30 Resultados

35 La figura 2 muestra el colesterol LDL plasmático durante el periodo de tratamiento en hámsteres tratados mediante inyección subcutánea una vez al día durante 5 días con el vehículo o 10 nmol/kg, 30 nmol/kg, 100 nmol/kg o 300 nmol/kg del Ejemplo 2. (**p<0,01 y ***p<0,001 frente al vehículo de prueba, ANOVA de dos vías, análisis post hoc de Dunnett).

40 La Figura 3 muestra la expresión hepática del LDL-R con respecto al control de carga pan-cadherina de muestras de hígado de hámsteres tratados mediante inyección subcutánea una vez al día durante 5 días con el vehículo o con el Ejemplo 2 10 nmol/kg, el Ejemplo 2 30 nmol/kg, el Ejemplo 2 100 nmol/kg o el Ejemplo 2 300 nmol/kg) (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 frente al vehículo, ANOVA de una vía, análisis post hoc de Dunnett).

45 En comparación con el vehículo, el peso corporal y la ganancia de peso no se vieron afectados en ningún tratamiento (datos no mostrados). Todas las dosis redujeron el LDL-colesterol (véase la Figura 2). Este efecto no fue significativo para la dosis más baja del Ejemplo 2, pero las dosis mayores de 100 y 300 nmol/kg redujeron los niveles de colesterol-LDL hasta un 35 % en el día 5. Estas tendencias fueron confirmadas además por el análisis de FPLC, que mostró reducciones sustanciales en los niveles de colesterol total en las fracciones correspondientes a LDL y HDL cuando los hámsteres fueron tratados con los artículos de prueba del Ejemplo 2 (datos no mostrados). También se demostró un aumento concomitante, dependiente de la dosis, de los niveles de expresión del LDL-R en los hígados (véase la Figura 2 y la Figura 3).

50 Conclusión

55 El estudio de dosis respuesta demuestra que es posible obtener un efecto significativo sobre el colesterol LDL al menos con una dosis de 30 nmol/kg después de 3 y 5 días de dosificación en los hámsteres sirios dorados con pienso normal. El efecto sobre el colesterol LDL es concomitante con niveles de expresión de receptores LDL hepáticos significativamente mayores.

60 D.5 Estudio de PK i.v. en perros

65 Para la determinación del perfil PK i.v. en perros, 3-4 perros Beagle (machos, 10-16 kg) se dosificaron por vía i.v. (2 nmol/kg, 0,1 ml/kg) con análogos de PCSK9 únicos o múltiples en cloruro de sodio 70 mM; fosfato 50 mM, polisorbato 20 70 ppm; pH=7,4. Antes de la dosificación, los perros se dejaron en ayunas durante toda la noche con libre acceso al agua corriente. Los análogos se dosificaron a través de la vena safena o cefálica mediante inyección única a través de una aguja (20 G) o dosificación secuencial a través de una cánula insertada. Se obtendrá una muestra de sangre de 0,8 ml en cada tubo con recubrimiento de EDTA a 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24,

48, 72, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288 horas después de la administración. Para el muestreo de las primeras 4 horas, se obtuvo una muestra sangre a través de una cánula insertada cuando los perros se inmovilizaron en una plataforma. El resto de los puntos de muestreo después de las 4 horas se obtuvieron a través de la vena yugular mediante punción con una única aguja (20 G). Inmediatamente después de la obtención de la muestra de sangre, 5 cada muestra se invirtió suavemente por 3-4 veces y se transfirió rápidamente a una caja con hielo antes de la preparación del plasma (10 min, 4 °C, 4000 rpm). Las muestras del plasma se mantuvieron a -20 °C antes del bioanálisis. La desviación máxima para el muestreo de sangre es 1 min en el día de la dosificación hasta 120 min posdosificación, 5 min para los puntos de tiempo de 4 a 10 horas, y dentro de 1 hora para el resto de los días.

10 Análisis del plasma:

El plasma del estudio de codosificación se pipeteó en tubos Micronic sobre hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta el análisis de la concentración plasmática de los derivados de PCSK9 respectivos mediante el uso de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS). Las muestras de plasma (que incluyen las muestras para la curva 15 estándar y QC, usadas para la cuantificación de desconocidos, y preparadas a partir de plasma estándar con adición de los derivados de PCSK9 a un intervalo de concentración nominal de 0.5-500 nM) se precipitaron las proteínas mediante el uso de tres volúmenes de metanol (que incluye el Ejemplo 4 como estándar interno) y se centrifugaron (16 000 x g, 4 °C, 30 min). Los sobrenadantes se inyectaron en el sistema cromatográfico (TurboFlow Transcend 20 1250 & 10 válvula VIM, Thermo Fisher Scientific) lo cual consistió de una columna de purificación Turboflow Cyclone inicial 0,5 x 50 mm (Thermo Fischer Scientific) y un péptido Aeris de elución 3,6 µm XB - columna C18 2,1 x 50 mm (Phenomenex) mantenida a 60 °C. Los derivados de PCSK9 se eluyeron mediante el uso de un gradiente cromatográfico con fase móvil que consistió en mezclas de agua y acetonitrilo/metanol 50/50 % v/v con ácido fórmico al 1 % v/v. Los derivados de PCSK9 se detectaron y cuantificaron después de la infusión en línea del flujo LC al espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) equipado con una interfase de 25 electropulverización que funcionó en modo positivo, ESI+. Durante el bioanálisis de las muestras de plasma, se observó un grado variable de isomerización para diferentes derivados de PCSK9. Todos los isómeros tienen masas monoisotópicas idénticas y se cuantifican juntos.

30 Los parámetros PK de cada análogo probado (por ejemplo, $T_{1/2}$) se analizaron mediante análisis no compartimental (NCA) mediante el uso del programa informático Phoenix WinNonlin, y los cálculos de las semividas se basan en los niveles de exposición de un total de todos los isómeros con la misma masa molecular.

Tabla 9: Semivida de los derivados del EGF(A) en perros después de dosificación i.v.

35	Ejemplo núm.	Variante del péptido	Codosificación de PK i.v. en perros $T_{1/2}$ (h)
	Ejemplo 3	301L, 309R, 312E, 333K	122
	Ejemplo 31	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	117
40	Ejemplo 81	301L, 309R, 312E, 333K	209
	Ejemplo 91	des293, 300H, 301L, 309R, 312E, 313K, 333K	34
	Ejemplo 95	des293, 301L, 309R, 312E, 313K	116
45	Ejemplo 128	301L, 309R, 312E, 313K, 333K	190
	Ejemplo 133	301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	115
	Ejemplo 143	301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	89
	Ejemplo 144	301L, 309R, 312E, 313K, 321E, 333K	193

50 D.6 Estudio de la captación oral en ratas

Los presentes estudios investigaron la absorción gastrointestinal de los péptidos coformulados y dosificados por vía oral a ratas saludables.

55 Animales:

Ratas Sprague Dawley machos de Taconic, Dinamarca, con 250 g a su llegada. Las ratas se adaptaron al menos una semana en la Unidad de animales, Novo Nordisk A/S, antes del estudio. El peso corporal al inicio del estudio fue de aproximadamente 280-300 g. Las ratas se dejaron en ayunas durante 18 horas en la rejilla antes de la dosificación.

60 Co-formulación de péptidos

65 La preparación de las formulaciones líquidas para la codosificación oral de los análogos de PCSK9i in vivo (ratas) se llevó a cabo como se describe más abajo.

La concentración objetivo del péptido EGF(A) fue de 200 μ M de cada análogo, formulado en una concentración objetivo de 55 mg/ml decanoato de sodio y agua. Se formularon de cinco a seis análogos peptídicos diferentes juntos en la misma formulación.

- 5 Brevemente, se preparó una solución madre (110 mg/ml) de decanoato de sodio mediante el uso de agua ultrapura y el pH de la solución se ajustó a 8,0 mediante el uso de HCl.
- 10 Los API se transfirieron a frascos de vidrio de 20 ml y se añadió 5 g de agua ultrapura (se asume una densidad de 1 mg/ml) y los API se dejaron disolver a temperatura ambiente en un mezclador de rodillo. El pH de la solución se ajustó subsecuentemente a 8,0 con NaOH hasta que el pH se estabilizó, después de lo cual se añadieron 6,5 g de la reserva de decanoato de sodio (concentración final 55 mg/ml) seguido por ajuste del pH a pH 8,0. La solución se mantuvo después a temperatura ambiente en un mezclador de rodillo durante toda la noche (protegida de la luz). Al día siguiente se realizó un ajuste final del pH a pH 8,0 en caso de ser necesario mediante el uso de NaOH.
- 15 El peso de la formulación final se ajustó a 13 g mediante el uso de agua ultrapura y subsecuentemente se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. El contenido de API y decanoato de sodio se determinó en la formulación final para garantizar una dosificación precisa. Las formulaciones se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.
- 20 La concentración de cada API en la formulación líquida se determinó mediante la absorbancia de luz UV a 215 nm.
- 25 Los métodos de LC se desarrollaron para garantizar que cada API de la codosificación eluya separadamente entre sí. Los estándares de concentraciones conocidas (determinadas mediante CLND) para cada API se mezclaron juntos, y en total se usaron cinco concentraciones de estándares para generar las curvas de calibración. La concentración final determinada fue un promedio obtenido a partir de tres muestras, cada una con dos repeticiones experimentales. La concentración de caprato en la formulación líquida se determinó de una manera similar, mediante el uso de una curva de calibración que consiste de tres concentraciones de estándares.

Dosificación:

- 30 Los animales se dosificaron por vía oral mediante sonda oral con una dosis objetivo de 1000 nmol/kg de cada péptido y un volumen de 5 ml/kg en el tiempo = 0

Muestreo de sangre y separación del plasma

- 35 Se tomaron muestras de sangre en los tiempos: 15, 30, 60 y 120 min después de la dosificación. Las muestras de sangre (200 μ l) se obtuvieron en tubos recubiertos con EDTA mediante punción de la vena de la lengua en ratas conscientes. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 G en 4 °C. El plasma (60-75 μ l) se separó y pipeteó en tubos Micronic (75 μ l) e inmediatamente se congeló a -20 °C.

Análisis del plasma:

- 40 El plasma del estudio de codosificación se pipeteó en tubos Micronic sobre hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta el análisis de la concentración plasmática de los derivados de PCSK9 respectivos mediante el uso de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS).. En las muestras de plasma (que incluyen las muestras para una curva estándar y QC, usadas para la cuantificación de desconocidos, y preparadas a partir de plasma estándar con adición de derivados de PCSK9 a un intervalo de concentración nominal de 0,5-500 nM) se precipitaron las proteínas mediante el uso de tres volúmenes de metanol o acetonitrilo con ácido fórmico al 1 % v/v (que incluye el ejemplo 4 como estándar interno) y se centrifugaron (16 000 x g, 4 °C, 30 min). Los sobrenadantes se inyectaron en el sistema cromatográfico (TurboFlow Transcend 1250 & 10 válvula VIM, Thermo Fisher Scientific) que consistió de una columna de purificación Turboflow Cyclone inicial 0,5 x 50 mm (Thermo Fischer Scientific) y un péptido Aeris de elución 3,6 μ m XB - columna C18 2,1 x 50 mm (Phenomenex) mantenida a 60 °C. Los derivados de PCSK9 se eluyeron mediante el uso de un gradiente cromatográfico con fase móvil que consistió en mezclas de agua y acetonitrilo/metanol 50/50 % v/v con ácido fórmico al 1 % v/v. Los derivados de PCSK9 se detectaron y cuantificaron después de una infusión en línea del flujo LC al espectrómetro de masas Q Exactive o LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) equipado con una interfase de electropulverización que operó en modo positivo, ESI+.
- 45 Durante el bioanálisis de las muestras de plasma, se observó un grado variable de isomerización para diferentes derivados de PCSK9. Todos los isómeros tienen masas monoisotópicas idénticas y se cuantifican juntos.

Cálculos de los datos:

- 60 De las concentraciones plasmáticas determinadas mediante LC-MS, se extrajeron las concentraciones plasmáticas máximas (Cmáx) para cada péptido en cada rata y la Cmáx/dosis se calculó como los valores medios \pm SD para n=6-8 ratas. La dosis se calculó como el volumen de la inyección, ajustado para el peso corporal, multiplicado con la concentración real del péptido, y la unidad es pmol/kg.
- 65 En cada grupo de coformulación se incluyó un péptido de referencia (ejemplo 3). En la tabla mencionada más abajo, se enumera la Cmáx/dosis (kg/l) para 8 péptidos diferentes junto con la Cmáx/dosis (kg/l) para el péptido de

referencia (Ejemplo 3). Los cálculos de Cmáx se basan en los niveles de exposición de un total de todos los isómeros con la misma masa molecular. Los resultados muestran que los derivados del EGF(A) se absorben bien generalmente.

5 Tabla 10. Concentraciones plasmáticas divididas por la dosis en ratas después de la codosificación oral de los derivados del EGF(A)

Ejemplo núm.	Cmáx/dosis (kg/l)	Cmáx/dosis para ref. Ejemplo 3 (kg/l)
Ejemplo 31	0,108 ± 0,086	0,053 ± 0,050
Ejemplo 81	0,024 ± 0,005	0,079 ± 0,013
Ejemplo 91	0,116 ± 0,032	0,083 ± 0,023
Ejemplo 95	0,106 ± 0,029	0,087 ± 0,023
Ejemplo 128	0,130 ± 0,013	0,087 ± 0,019
Ejemplo 133	0,071 ± 0,017	0,057 ± 0,015
Ejemplo 143	0,151 ± 0,038	0,096 ± 0,029
Ejemplo 144	0,100 ± 0,025	0,057 ± 0,015

20 Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

25 <120> ANÁLOGOS DEL EGF(A) CON SUSTITUYENTES DE ÁCIDOS GRASOS

<130> 150089

<160> 106

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 40

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

40 <400> 1

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45

Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 2

<211> 40

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

60 <400> 2

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Ala Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Ile Cys
1 5 10 15

65

Arg Lys Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln

ES 2 916 998 T3

20 25 30

5 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

10 <210> 3
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia sintética

15 <400> 3

20 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

30 <210> 4
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética

35 <400> 4

40 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

50 <210> 5
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Sintética

55 <400> 5

60 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Pro Leu Gly Gly Cys Ser His Ile Cys
1 5 10 15

60 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

ES 2 916 998 T3

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

5 <210> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 6

15 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

25 <210> 7
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 7

35 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Lys Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

45 <210> 8
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 8

55 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

60 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

65 Leu Val Ala Gln Arg Lys Cys Glu
35 40

ES 2 916 998 T3

5 <210> 9
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 9

15	Asn	Thr	Asn	Glu	Cys	Leu	Asp	Asn	Leu	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Ile	Cys
	1				5					10					15	

20	Glu	Cys	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Gln	de	Arg	Asp	Lep	Asp	Ile	Gly	Tyr
				20					25					30			

25	Leu	Val	Ala	Gln	Arg	Arg	Cys	Glu	Lys								
				35					40								

30 <210> 10
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 10

35	Asn	Thr	Asn	Glu	Cys	Leu	Asp	Asn	Leu	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Val	Cys
	1				5					10					15	

40	Glu	Cys	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Gln	de	Arg	Asp	Lep	Asp	Ile	Gly	Tyr
				20					25					30			

45	Leu	Val	Ala	Gln	Arg	Arg	Cys	Glu	Lys								
				35					40								

50 <210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 11

55	Gly	Thr	Asn	Glu	Cys	Leu	Asp	Asn	Leu	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Val	Cys
	1				5					10					15	

60	Arg	Asp	Leu	Glu	Ile	Gly	Tyr	Glu	Cys	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Gln
				20					25					30		

65	Leu	Val	Ala	Gln	Arg	Arg	Cys	Glu	Lys								
				35					40								

70 <210> 12
 <211> 40
 <212> PRT

ES 2 916 998 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

5

<400> 12

Lys Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

15

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

20

<210> 13

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 13

30

Lys Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

35

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

40

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

45

<210> 14

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 14

55

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

60

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

65

Leu Val Ala Lys His Arg Cys Glu
35 40

<210> 15

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 916 998 T3

<223> Secuencia sintética

<400> 15

5 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

15 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys Lys
35 40

<210> 16

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 16

25 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Arg Lys Cys Glu Lys
35 40

<210> 17

<211> 41

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

45 <400> 17

50 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

55 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Lys Gly Phe Gln
20 25 30

55 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 18

<211> 41

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

65 <400> 18

ES 2 916 998 T3

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

5 Arg Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

10 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 19
<211> 41
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

20 <400> 19

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

25 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln
20 25 30

30 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 20
<211> 40
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

40 <400> 20

Gly Thr Asp Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

55 <210> 21
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 21

65 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

ES 2 916 998 T3

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Lys Gly Phe Gln
20 25 30

5

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

10 <210> 22
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 22

20 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

25 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

30 <210> 23
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 23

40 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45 Arg Asp Leu Gln Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

50 <210> 24
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 24

60 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

65 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln

ES 2 916 998 T3

	20	25	30
5	Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys 35 40		
10	<210> 25 <211> 40 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
15	<220> <223> Secuencia sintética		
20	<400> 25		
	Lys Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys 1 5 10 15		
25	Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln 20 25 30		
30	Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu 35 40		
35	<210> 26 <211> 40 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Secuencia sintética		
45	<400> 26		
	Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Ile Cys 1 5 10 15		
50	Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln 20 25 30		
55	Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu 35 40		
60	<210> 27 <211> 40 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
65	<220> <223> Secuencia sintética		
	<400> 27		
	Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Lys Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys 1 5 10 15		
	Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln 20 25 30		

ES 2 916 998 T3

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

5 <210> 28
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 28

15 Lys Lys Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

25 <210> 29
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 29

35 Lys Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Arg Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

45 <210> 30
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 30

55 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

60 Lys Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

65 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

ES 2 916 998 T3

ES 2 916 998 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

5

<400> 34

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

15

Lys Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

20

<210> 35

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 35

30

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Lys Gln
20 25 30

35

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

40

<210> 36

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 36

50

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

55

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Lys Phe Gln
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

60

<210> 37

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

ES 2 916 998 T3

<223> Secuencia sintética

<400> 37

5 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Lys Asp Gly Phe Gln
20 25 30

15 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 38

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 38

25 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Lys Arg Cys Glu
35 40

<210> 39

<211> 40

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

45 <400> 39

50 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

55 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

55 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 40

<211> 40

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

65 <400> 40

ES 2 916 998 T3

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

5 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

10 Leu Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu
35 40

15 <210> 41
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética

25 <400> 41
Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

40 <210> 42
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética

50 <400> 42
Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

55 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Lys Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

60 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

65 <210> 43
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 43
Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

ES 2 916 998 T3

Arg Asp Leu Arg Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

5 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 44
<211> 40
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética
15 <400> 44

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Glu Ile Lys Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 45
30 <211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Secuencia sintética
<400> 45

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Arg Asp Lys Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

50 <210> 46
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia sintética
<400> 46

60 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Lys Cys
1 5 10 15

65 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

ES 2 916 998 T3

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

5 <210> 47
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 47

15 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Ser Asp Leu Arg Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

25 <210> 48
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 48

35 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Ser Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

45 <210> 49
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 49

55 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Tyr Val Cys
1 5 10 15

60 Ser Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

65 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

ES 2 916 998 T3

ES 2 916 998 T3

<<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia sintética

10 <400> 53

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Lys Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

15 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

20 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

25 <210> 54
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética

35 <400> 54

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Lys Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

50 <210> 55
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Secuencia sintética

60 <400> 55

Asn Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

65 Arg Asp Leu Arg Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

60 <210> 56
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 916 998 T3

<223> Secuencia sintética

<400> 56

5 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Lys Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

15 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 57

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 57

25 Gly Thr Asn Glu Cys Lys Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 58

<211> 41

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

45 <400> 58

Asn Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

50 Arg Asp Leu Arg Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

55 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 59

<211> 40

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

65 <400> 59

ES 2 916 998 T3

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Ile Cys
1 5 10 15

5 Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

10 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

<210> 60
<211> 40
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética
20 <400> 60

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Tyr Val Cys
1 5 10 15

25 Asn Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

30 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

<210> 61
<211> 40
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética
40 <400> 61

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Ile Cys
1 5 10 15

45 Asn Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

<210> 62
<211> 40
55 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética
60 <400> 62

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

65

ES 2 916 998 T3

Arg Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

5 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

10 <210> 63
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 63

20 Gly Thr Asn Lys Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

25 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

30 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

35 <210> 64
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 64

40 Gly Lys Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

55 <210> 65
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 65

60 Lys Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val
1 5 10 15

65 Cys Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe
20 25 30

ES 2 916 998 T3

Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
 35 40

5 <210> 66
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética

15 <400> 66

Gly Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys Arg	1	5	10	15
---	---	---	----	----

20 Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu

20	25	30
----	----	----

25 Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu
 35

30 <210> 67
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia sintética

40 <400> 67

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Asp Val Cys	1	5	10	15
---	---	---	----	----

45 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gly

20	25	30
----	----	----

50 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
 35 40

55 <210> 68
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia sintética

65 <400> 68

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Asp Val Cys	1	5	10	15
---	---	---	----	----

65 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln

20	25	30
----	----	----

65 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys

ES 2 916 998 T3

35 40

5 <210> 69
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

15 <400> 69

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

30 <210> 70
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética

40 <400> 70

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50 Leu Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu
35 40

55 <210> 71
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Secuencia sintética

65 <400> 71

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

70 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

75 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

80 <210> 72

ES 2 916 998 T3

<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 72

10 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

15 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

20 <210> 73
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 73

30 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

35 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Lys Gly Phe Gln
20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

40 <210> 74
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 74

50 Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys Arg
1 5 10 15

55 Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu
20 25 30

60 Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

65 <210> 75
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 916 998 T3

<220>
<223> Secuencia sintética

5 <400> 75

Ala Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val
1 5 10 15

10 Cys Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe
20 25 30

15 Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 76
<211> 39

20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

25 <400> 76

Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys Arg
1 5 10 15

30 Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu
20 25 30

35 Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35

<210> 77
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 77

50 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

55 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

60 <210> 78
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Secuencia sintética

ES 2 916 998 T3

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

5 Asn Asp Leu Lys Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

10 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

15 <210> 82
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> sintético

25 <400> 82

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

40 <210> 83
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> sintético

50 <400> 83

Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys Arg Asp
1 5 10 15

55 Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu Val
20 25 30

60 Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35

65 <210> 84
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sintética

<400> 84

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

ES 2 916 998 T3

Lys Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

5 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

10 <210> 85
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> sintética

<400> 85

20 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Tyr Val Cys
1 5 10 15

25 Asn Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

30 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

35 <210> 86
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> sintética

<400> 86

45 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

Arg Asp Leu Glu Ile Lys Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

55 <210> 87
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> sintética

<400> 87

65 Gly Trp Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

ES 2 916 998 T3

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

5 <210> 88
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> sintética

15 <400> 88
Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Lys Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

25 Leu Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu
35 40

30 <210> 89
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> sintética

35 <400> 89
Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

40 Lys Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

45 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

50 <210> 90
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> sintética

55 <400> 90
Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys Arg
1 5 10 15

60 Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln Leu
20 25 30

65 Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys

ES 2 916 998 T3

35 40

5 <210> 91
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> sintética

15 <400> 91

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

20 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

25 30 Leu Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu
35 40

25 <210> 92
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> sintética

35 <400> 92

Ala Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val
1 5 10 15

40 Cys Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Ph
20 25 30

45 Gln Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

45 <210> 93
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> sintética

55 <400> 93

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser Tyr Val Cys
1 5 10 15

60 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

65 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 94

ES 2 916 998 T3

<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> sintética

<400> 94

10 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

20 <210> 95
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

100 25

30 Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
 1 5 10 15

35 Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Lys Gly Phe Gln
 20 25 30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

<210> 96
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<400> 96

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

55 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

<210> 97
<211> 40
<212> PRT
65

ES 2 916 998 T3

<220>
<223> sintética

5 <400> 97

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

10 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln
20 25 30

15 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Lys
35 40

<210> 98
<211> 41

20 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> sintética

25 <400> 98

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

30 Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln
20 25 30

35 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys
35 40

<210> 99
<211> 40

40 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sintética

45 <400> 99

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

50 Arg Asp Leu Glu Lys Lys Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

55 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 100
<211> 40

60 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sintética

65

ES 2 916 998 T3

<400> 100

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

5

Arg Asp Leu Lys Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

10

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 101

15 <211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> sintética

<400> 101

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

25

Arg Asp Leu Lys Ile Lys Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

30

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

<210> 102

35 <211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> sintética

<400> 102

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys
1 5 10 15

45

Arg Asp Lys Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Gln
20 25 30

50

Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

55 <210> 103

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> sintética

<400> 103

65

Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp His Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys

ES 2 916 998 T3

	1	5	10	15	
5	Arg Asp Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln				
	20	25	30		
10	Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys				
	35	40			
15	<210> 104				
	<211> 41				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
20	<220>				
	<223> sintética				
	<400> 104				
25	Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys				
	1	5	10	15	
30	Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Gln				
	20	25	30		
	Leu Val Ala Lys Arg Arg Cys Glu Lys				
	35	40			
	<210> 105				
	<211> 41				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
	<223> sintética				
40	<400> 105				
	Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys				
	1	5	10	15	
45	Arg Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Glu Gly Phe Lys				
	20	25	30		
50	Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu Lys				
	35	40			
	<210> 106				
	<211> 40				
	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
	<220>				
	<223> Sintética				
60	<400> 106				
	Gly Thr Asn Glu Cys Leu Asp Asn Leu Gly Gly Cys Ser His Val Cys				
	1	5	10	15	
65					

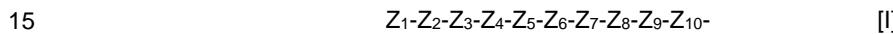
ES 2 916 998 T3

Lys Asp Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Cys Leu Cys Pro Asp Gly Phe Lys
20 25 30

5 Leu Val Ala Gln Arg Arg Cys Glu
35 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un derivado del EGF(A) que comprende un análogo peptídico del EGF(A) que comprende 301Leu y un sustituyente que comprende al menos un grupo de ácido graso, en donde el análogo peptídico del EGF(A) tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), aminoácidos 293-332 del LDL-R, definido mediante la SEQ ID NO:1 y en donde el derivado tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la sección D1.1 de la descripción.
- 10 2. El derivado del EGF(A) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sustituyente comprende un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un resto tetrazol, un resto metilsulfonilcarbamolamino o un resto 3-hidroxi-isoxazol y 8-20 grupos $-\text{CH}_2-$ consecutivos.
- 15 3. El derivado del EGF(A) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sustituyente tiene la Fórmula I:



en donde

20 Z_1 se selecciona de:

- 20 Quím. 1: $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$,
 Quím. 2: $\text{tetrazolil-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$,
 25 Quím. 3: $\text{HOOC-(C}_6\text{H}_4\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO-}^*$,
 Quím. 4: $\text{HOS(O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$,
 30 Quím. 5: $\text{MeS(O)}_2\text{NH(CO)N-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$ y
 Quím. 6: $\text{3-HO-Isoxazol-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}^*$

en donde

35 n es un número entero en el intervalo de 8-20,
 m es un número entero en el intervalo de 8-11,
 el grupo $-\text{COOH}$ en Quím. 3 puede estar unido a la posición 2, 3 o 4 del anillo de fenilo, el símbolo $*$ indica el punto de unión al nitrógeno en Z_2 o, si Z_2 es un enlace, al nitrógeno del elemento Z vecino;

40 Z_2 se selecciona de

- 40 Quím. 7: $^*\text{-NH-SO}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CO-}^*$,
 Quím. 8: $^*\text{-NH-CH}_2\text{-(C}_6\text{H}_{10}\text{)-CO-}^*$ y

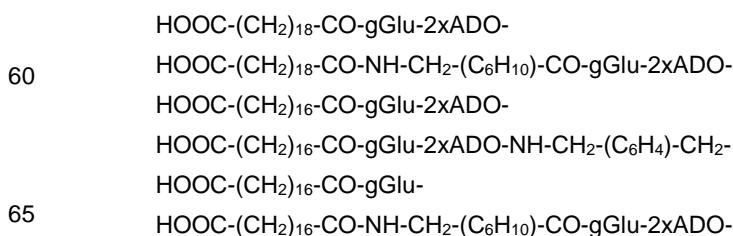
45 un enlace;

Z_3 se selecciona de:
 γGlu , Glu y un enlace;

50 Z_4 , Z_5 , Z_6 , Z_7 , Z_8 , Z_9 se seleccionan, independientemente entre sí, de:
 Glu, γGlu , Gly, Ser, Ala, Thr, Ado, AEEP, AEEEP, TtdSuc y un enlace;
 Z_{10} se selecciona de:

- 55 Quím. 14: $^*\text{-NH-CH}_2\text{-(C}_6\text{H}_4\text{)-CH}_2\text{-}^*$ y un enlace.

55 4. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el derivado del EGF(A) comprende uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

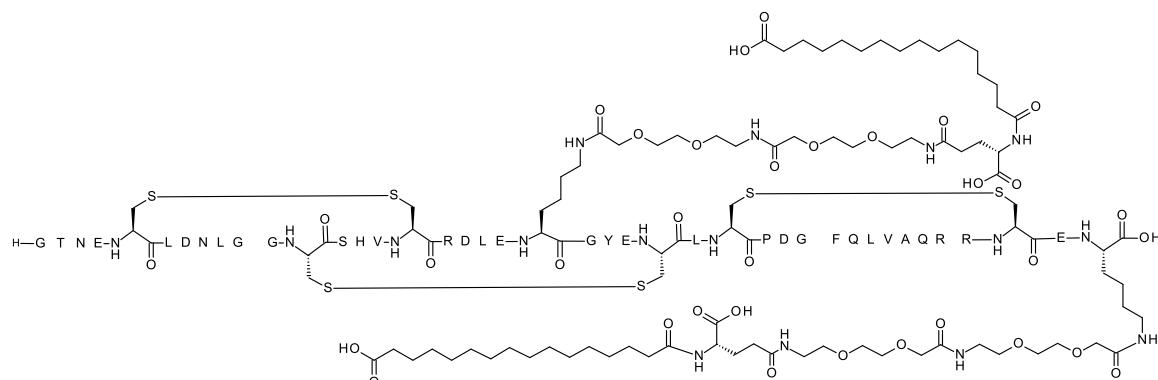


HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-2xADO-
 HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-
 HOOC-(CH₂)₁₄-CO-gGlu-2xADO-
 5 HOOC-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-2xADO-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-3xADO-
 10 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-2xgGlu-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-2xADO-
 15 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-TtdSuc-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₉-CO-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-gGlu-4xADO-
 20 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₁₀-CO-NH-CH₂-(C₆H₁₀)-CO-gGlu-2xADO-
 4-HOOC-(C₆H₄)-O-(CH₂)₉-CO-gGlu-2xADO-
 3-HO-Isoxazol-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO-
 25 HOS(O)₂-(CH₂)₁₅-CO-gGlu-2xADO-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-
 HOS(O)₂-(CH₂)₁₃-CO-gGlu-2xADO-
 Tetrazolil-(CH₂)₁₅-CO-NH-SO₂-(CH₂)₃-CO-ADO-ADO-NH-CH₂-(C₆H₄)-CH₂-
 30 Tetrazolil-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO-
 Tetrazolil-(CH₂)₁₅-CO-gGlu-2xADO- y
 MeS(O)₂NH(CO)NH-(CH₂)₁₂-CO-gGlu-2xADO-.
 35 5. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende uno, dos, tres, cuatro o los cinco del(de los) siguiente(s) residuo(s) de aminoácido(s) (natural(es)): 295Asn, 296Glu, 298Leu, 302Gly y 310Asp.
 6. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo 310Asp natural.
 40 7. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende el residuo 295Asn natural.
 8. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 299Asp (D) o 299Ala (A).
 45 9. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 307Ile (I).
 10. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 309Arg (R).
 50 11. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende una sustitución de 312Lys por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: 312Glu, 312Asp, 312Gln y 312Arg.
 55 12. El derivado del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos identificadas mediante cualquiera de los grupos:
 60 i. 301Leu y 309Arg
 ii. 301Leu, 309Arg, 312Glu
 iii. 301Leu, 307Ile y 309Arg
 iv. 301Leu, 307Ile, 309Arg y 312Glu
 65 v. 301Leu, 309Arg y 321Glu

5

10

15

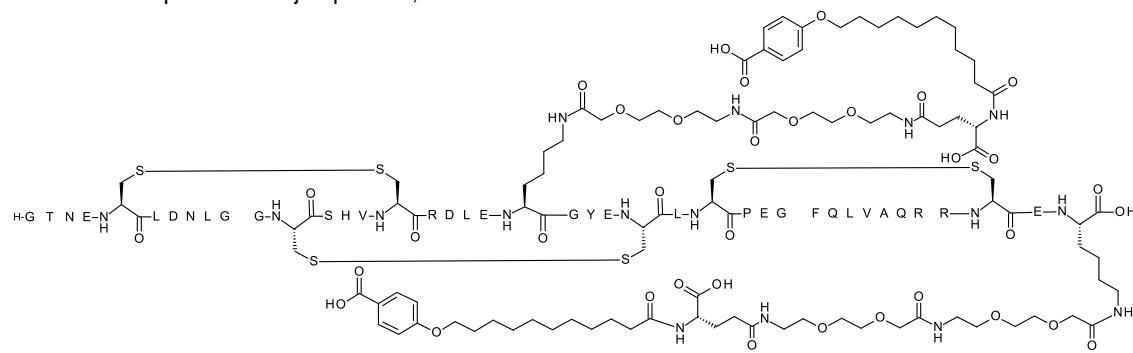


en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 32,
iv. Compuesto del ejemplo 133,

20

25

30

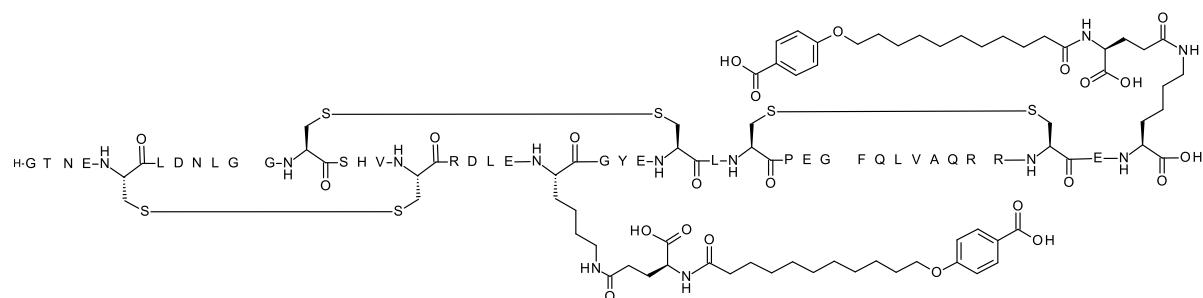


en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98,
v. Compuesto del ejemplo 143,

35

40

45

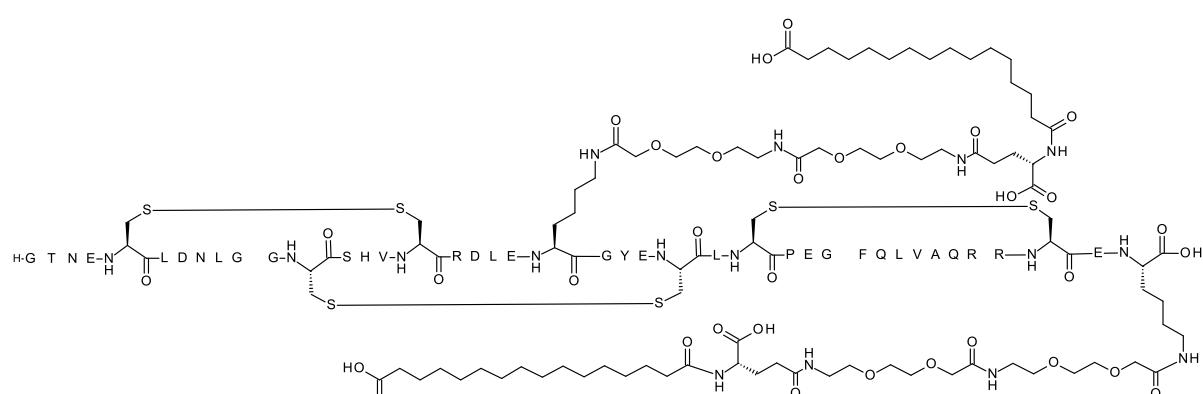


en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO: 98,
vi. Compuesto del ejemplo 144,

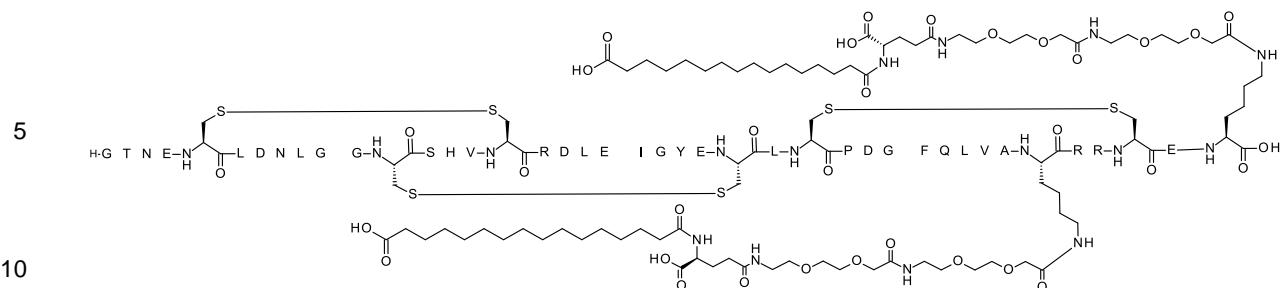
50

55

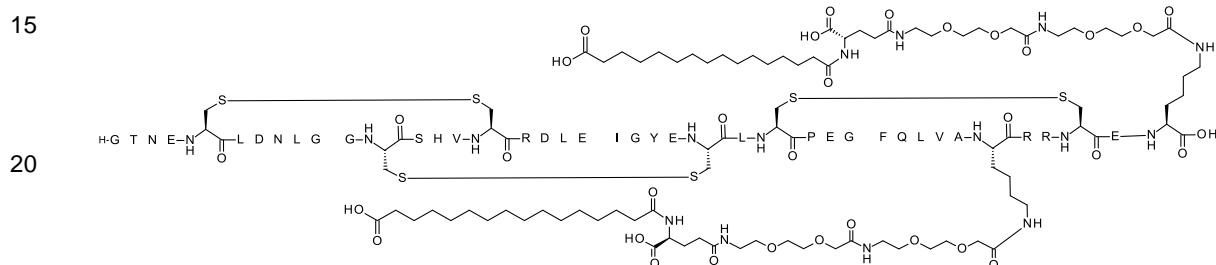
60



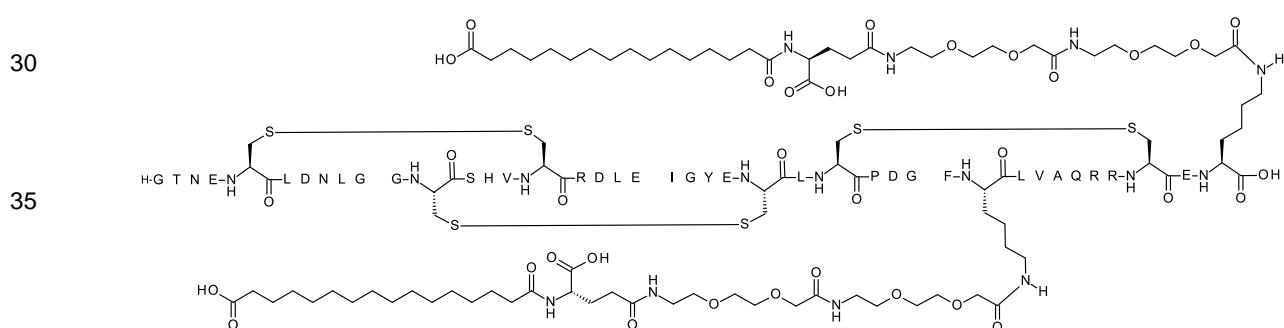
en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:98,
vii. Compuesto del ejemplo 150,



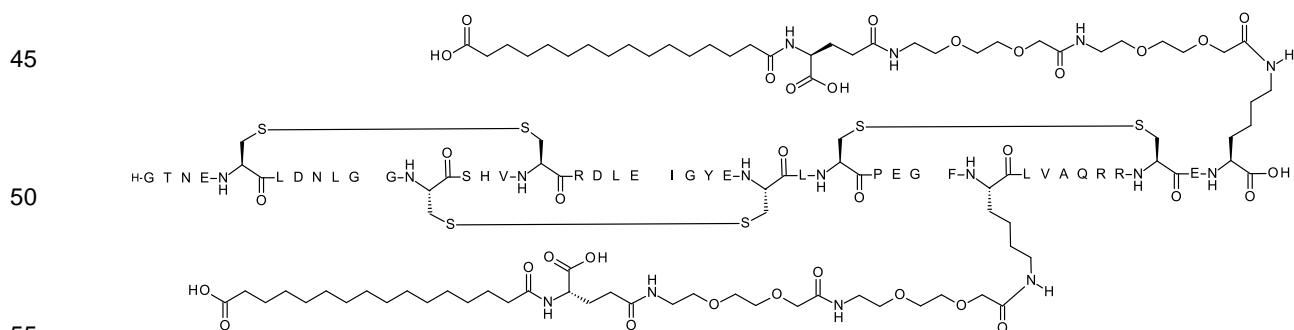
en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:78,
viii. Compuesto del ejemplo 151,



25 en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:104,
ix. Compuesto del ejemplo 152

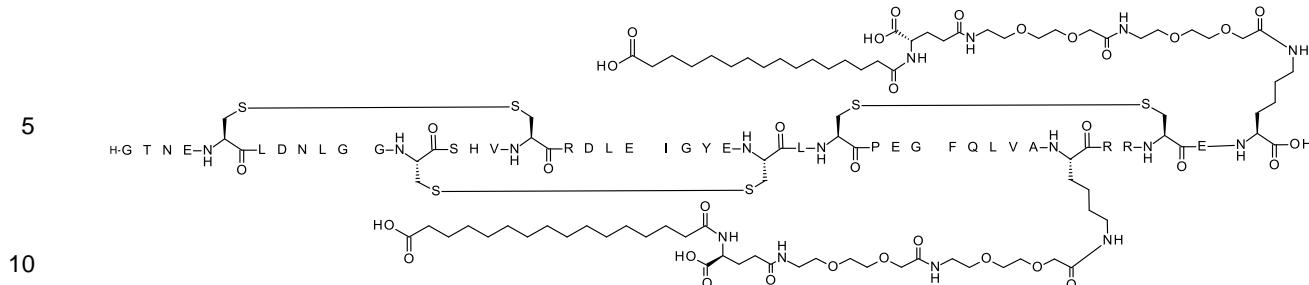


en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:72, y el
x. Compuesto del ejemplo 153



en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:105.

60 18. Un derivado del EGF(A) N{alfa}(N{épsilon}-328)-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15- carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [Leu301,Arg309,Glu312,Glu321,Lys328]-LDL-R-(293-332)-peptidil)-N{épsilon}-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]Lys (Compuesto del ejemplo 151),



en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena principal del péptido es la SEQ ID NO:104.

- 15 19. Un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definidos mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu, 310Asp y una sustitución de aminoácidos de 312Lys y en donde el análogo tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la sección D1.1 de la descripción.

20 20. Un análogo peptídico del EGF(A) que tiene 1-8 sustituciones de aminoácidos en comparación con el dominio EGF(A), los aminoácidos 293-332 del LDL-R, definidos mediante la SEQ ID NO 1, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende 301Leu y 310Asp y en donde el péptido no tiene una sustitución de 299Asp por Glu, Val o His y en donde el análogo tiene una Ki por debajo de 5 nM cuando se mide en un ELISA competitivo de unión de PCSK9-LDL-R, como se describió en la descripción de la sección D1.1.

25 21. El análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en donde el análogo peptídico del EGF(A) comprende los residuos 297Cys, 304Cys, 308Cys, 317Cys, 319Cys y 331Cys.

30 22. El análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 19-21, en donde el análogo peptídico del EGF(A) se define como el análogo peptídico del EGF(A) en cualquiera de las reivindicaciones 5-12.

35 23. El análogo peptídico del EGF(A) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 19-22, el EGF(A) comprende, además, al menos una sustitución de Lys seleccionada del grupo que consiste en: 292Lys, 293Lys, 294Lys, 296Lys, 299Lys, 300Lys, 303Lys, 305Lys, 306Lys, 309Lys, 311Lys, 313Lys, 314Lys, 315Lys, 316Lys, 318Lys, 320Lys, 321Lys, 322Lys, 323Lys, 324Lys, 325Lys, 326Lys, 327Lys, 328Lys, 329Lys, 330Lys, 332Lys y 333Lys.

Figura 1

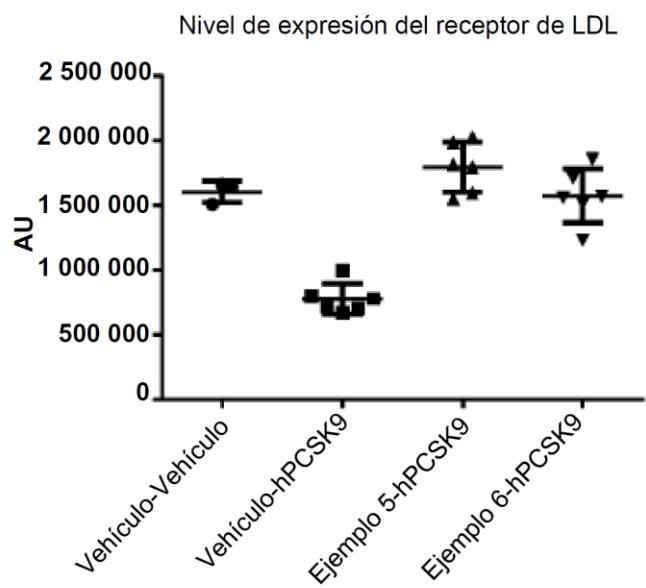


Figura 2

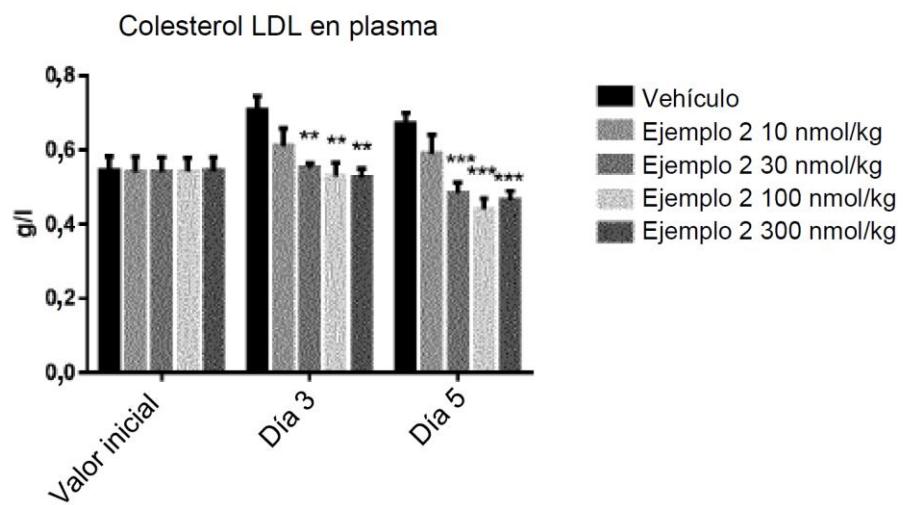


Figura 3

