

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 907**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68	(2007.01) A61P 3/10	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01) C07K 14/575	(2006.01)
A61K 38/04	(2006.01) C07K 16/24	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61P 3/00	(2006.01)	
A61P 3/04	(2006.01)	
A61P 3/06	(2006.01)	
A61P 3/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2017** **E 21198106 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025** **EP 3988123**

54 Título: **Compuestos de tirosina de péptidos cíclicos acoplados a anticuerpos como moduladores de los receptores del neuropéptido Y**

30 Prioridad:

27.10.2016 US 201662413586 P
27.10.2016 US 201662413613 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2025

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.00%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

MACIELAG, MARK;
MACIELAG, MARK;
PATCH, RAYMOND J.;
ZHANG, RUI;
CASE, MARTIN A.;
RANGWALA, SHAMINA M.;
LEONARD, JAMES N.;
CAMACHO, RAUL, C.;
HUNTER, MICHAEL J.;
D'AQUINO, KATHARINE E;
EDWARDS, WILSON;
SWANSON, RONALD V.;
JIAN, WENYING;
ZHANG, YUE-MEI;
WALL, MARK y
CHI, ELLEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o

ES 3 025 907 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).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 907**

Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 3 025 907 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

Compuestos de tirosina de péptidos cíclicos acoplados a anticuerpos como moduladores de los receptores del neuropéptido Y

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se dirige generalmente a nuevos conjugados de péptidos cíclicos tirosina-tirosina acopados a anticuerpos (PYY), que son moduladores del receptor del neuropéptido Y2. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas y a sus usos. Los nuevos compuestos acoplados a anticuerpos son útiles para prevenir, tratar o mejorar enfermedades y trastornos, tales como la obesidad, la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina y la dislipidemia, entre otros.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE

[0002] Esta solicitud contiene un listado de secuencias, que se envía electrónicamente a través de EFS-Web como un listado de secuencias con formato ASCII con un nombre de archivo "PRD3436 Sequence Listing" y una fecha de creación del 23 de octubre de 2017, y que tiene un tamaño de 135 kb. El listado de secuencias enviado a través de EFS-Web es parte de la especificación. En caso de cualquier inconsistencia con respecto a las estructuras para los SEQ ID NO: 1-156 entre la información descrita en este documento y el Listado de secuencias enviado electrónicamente a través de EFS-Web con un nombre de archivo "PRD3436 Sequence Listing", prevalecerá la información contenida en este documento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Los receptores del neuropéptido Y (NPY) son activados por un grupo estrechamente relacionado de agonistas peptídicos denominados "familia NPY" que tienen diferentes afinidades para cada subtipo de receptor. El NPY, el péptido tirosina-tirosina (PYY) y el polipéptido pancreático (PP), todos ellos de 36 aminoácidos de longitud, son agonistas de la familia de receptores NPY. El NPY es un neurotransmisor, sintetizado, cotransformado y liberado con norepinefrina y epinefrina. El NPY es uno de los péptidos más abundantes y ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) de humanos y roedores y se expresa en áreas del cerebro relacionadas con la alimentación y el estrés. En el sistema nervioso periférico, las neuronas que contienen NPY son predominantemente simpáticas. El PYY es sintetizado y liberado predominantemente por células endocrinas intestinales. La escisión de NPY y PYY por la serina proteasa endotelial, di-peptidil peptidasa IV (DPP-IV), genera NPY₃₋₃₆ y PYY₃₋₃₆, que son ligandos selectivos para los subtipos Y2 e Y5 de la familia de receptores NPY. La PP se encuentra principalmente en células de los islotes pancreáticos distintas de las que almacenan insulina, glucagón o somatostatina.

[0004] Hasta la fecha se han identificado cinco receptores de NPY distintos, cuatro de los cuales se entienden como relevantes para la fisiología humana. Los receptores Y1, Y2 e Y5 se unen preferentemente a NPY y PYY, mientras que el receptor Y4 se une preferentemente a PP. Los receptores Y2 e Y5 también son activados de forma potente por NPY₃₋₃₆ y PYY₃₋₃₆. En general, la familia de ligandos NPY posee una selectividad variable para cada una de las isoformas del receptor de NPY, y se ha informado anteriormente que PYY₃₋₃₆ tiene una selectividad modesta a robusta para la isoforma Y2. Cada uno de estos receptores está acoplado a la inhibición de la adenilato ciclasa a través de G_{ai} sensible a la toxina pertussis.

[0005] El PYY se secreta a partir de células L endocrinas en respuesta a los alimentos, y en particular después de la ingestión de grasas. El PYY₁₋₃₆ predomina en el estado de ayuno, siendo el PYY₃₋₃₆ la forma principal encontrada posprandialmente en humanos, con concentraciones plasmáticas correlacionadas negativamente con la cantidad de calorías consumidas. Se ha demostrado que el PYY₃₋₃₆ reduce la ingesta de alimentos en humanos, monos, ratas, conejos y ratones (Batterham RL et al. Nature 2002 Aug 8; 418(6898):650-4; Batterham RL et al. N Engl J Med 2003 Sep 4; 349(10):941-8; Challis BG et al., Biochem Biophys Res Commun 2003 Nov 28;311(4):915-9). Se cree que los efectos anorexigénicos de PYY₃₋₃₆ están mediados por Y2, basándose en la unión preferencial a este receptor y la pérdida de eficacia alimentaria en ratones deficientes en Y2 (Batterham RL, et al. Nature 2002 Aug 8; 418(6898):650-4). La inyección intraarqueada de PYY₃₋₃₆ reduce la ingesta de alimentos en ratas y ratones (Batterham et al. Nature 2002 Aug 8; 418(6898):650-4), lo que sugiere que la participación de los receptores hipotalámicos Y2 puede mediar estos efectos. También se ha demostrado que los efectos agudos sobre la alimentación se traducen en efectos dependientes de la dosis sobre el peso corporal en ratones *ob/ob*, ratones DIO y ratones Zucker *fa/fa* (Pittner RA et al. IntJObes relat Metab Disord 2004 Aug; 28(8):963-71). Además, también se ha demostrado que PYY₃₋₃₆ mejora la eliminación de glucosa mediada por insulina y la sensibilidad a la insulina en roedores DIO (Vrang N et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol Aug; 291(2):R367-75). La cirugía bariátrica produce un aumento de la inmunorreactividad circulante de PYY (le Roux CW et al., Ann Surg 2006 Jan; 243(1):108-14), que parece desempeñar un papel en la pérdida de peso posoperatoria.

[0006] Dada su función en el control del apetito y la ingesta de alimentos, así como sus efectos antiseoretos y proabsortivos en el tracto gastrointestinal de los mamíferos, el PYY₃₋₃₆ puede ser eficaz en el tratamiento de la obesidad y afecciones asociadas, así como en una serie de trastornos gastrointestinales. Sin embargo, la utilidad terapéutica del propio PYY₃₋₃₆ como agente de tratamiento está limitada por su rápido metabolismo y la corta vida media circulante resultante (Torang et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310:R866-R874 (2016)).

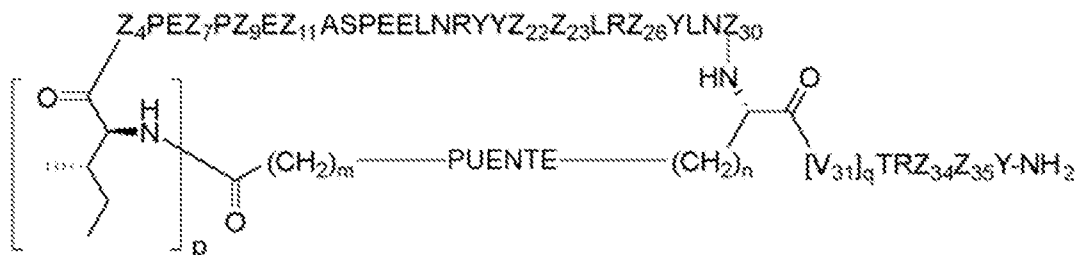
[0007] Por lo tanto, es deseable obtener un análogo de PYY o un derivado del mismo con una estabilidad metabólica y un perfil farmacocinético mejorados en relación con PYY₃₋₃₆. Dichos derivados, con una vida media prolongada *in vivo*, proporcionarían una modulación del receptor Y2 con una mayor duración de acción, lo que los hace adecuados como agentes terapéuticos para sujetos que necesitan dicha modulación.

[0008] El documento WO 2015/197735 divulga un complejo no covalente de un anticuerpo haptenilado que se une específicamente a Tau(pS422) humana y un anticuerpo biespecífico anti-receptor de barrera hematoencefálica/hapteno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. En un aspecto general, la invención se refiere a nuevos compuestos de péptidos cíclicos tirosina-tirosina (PYY) acoplados a anticuerpos, que son moduladores del receptor del neuropéptido Y2.

[0010] En el presente documento se proporcionan conjugados que comprenden: (a) un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2, una HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3, que tienen las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 y 146, respectivamente; y (b) al menos dos péptidos PYY cíclicos, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con los al menos dos péptidos PYY cíclicos, en donde los al menos dos péptidos PYY cíclicos están representados por la Fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



Fórmula I

en donde

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

n es 1, 2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ esté ausente;

PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S o R;

Z₇ es A o K;

Z₉ es G o K;

Z₁₁ es D o K;

Z₂₂ es A o K;

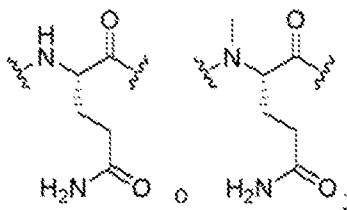
Z₂₃ es S o K;

Z₂₆ es A o H;

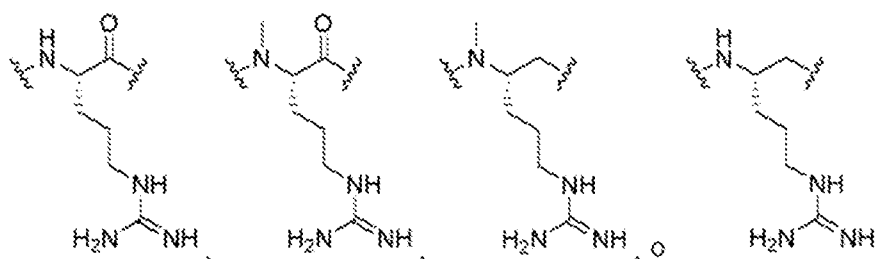
Z₃₀ es L, W, ausente o K;

siempre que Z₃₀ esté ausente solo cuando q sea 1;

Z₃₄ es

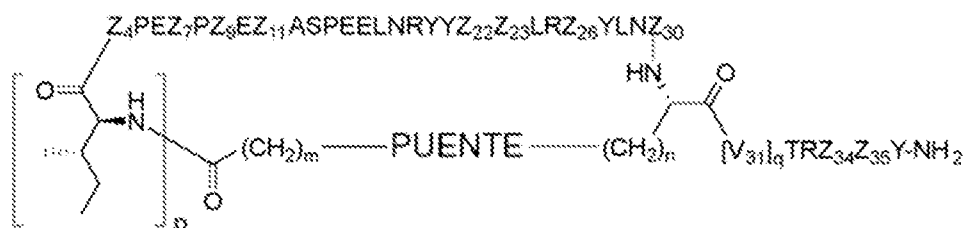


Z₃₅ es



en donde el derivado es el compuesto de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, glicosilación, carbamilación, sulfatación, fosforilación, ciclización, lipidación y pegilación.

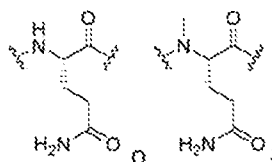
La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende: (a) un conjugado; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable; en donde el conjugado comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo acoplado a un péptido PYY cíclico, comprendiendo el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2, una HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3, que tienen las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 y 146, respectivamente; y en donde el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



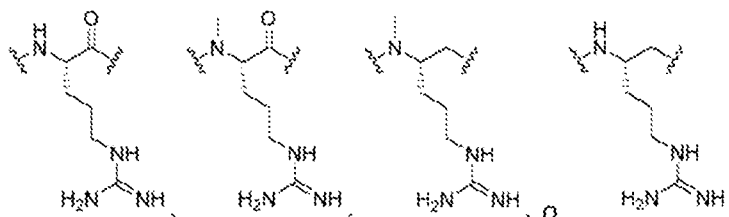
Fórmula I

en donde

p es 0 o 1;
m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
n es 1, 2,
q es 0 o 1; siempre que q es 1 únicamente cuando Z₃₀ está ausente;
PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)-, o -CH₂S-;
Z₄ es K, A, E, S, o R;
Z₇ es A o K;
Z₉ es G o K;
Z₁₁ es D o K;
Z₂₂ es A o K;
Z₂₃ es S o K;
Z₂₆ es A o H;
Z₃₀ es L, W, ausente, o K;
Siempre que Z₃₀ está ausente únicamente cuando q es 1;
Z₃₄ es



Z₃₅ es



en donde el derivado es el compuesto de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, glicosilación, carbamilación, sulfatación, fosforilación, ciclización, lipidación y pegilación,

para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética, hipertensión, niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema,

comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición farmacéutica en combinación con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4); un agonista del receptor GLP-1; un inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa-2 (SGLT-2); un secuestrante de ácidos biliares; un agonista del receptor de dopamina; una biguanidina; insulina; oxintomodulina; una sulfonilurea; y una tiazolidinediona.

En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico es un compuesto de Fórmula I o un derivado del péptido PYY cíclico de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, lipidación y pegilación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0011] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

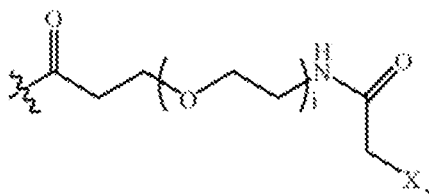
n es 1, 2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ esté ausente;

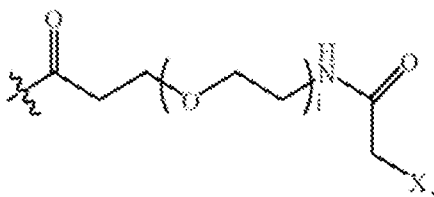
PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)-, o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S, o R;

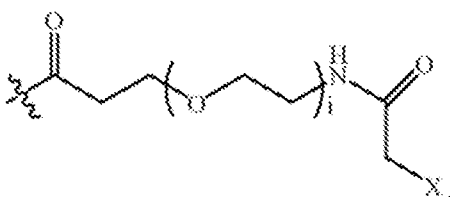
Z₇ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



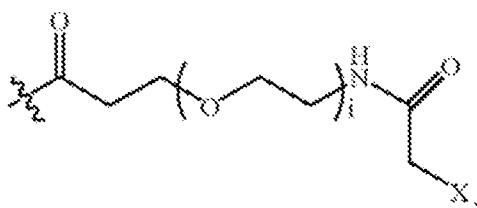
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl; Z₉ es G o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



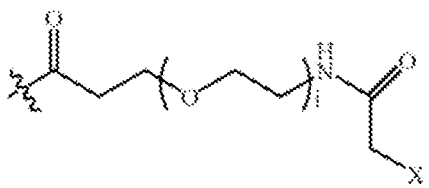
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl; Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl; Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



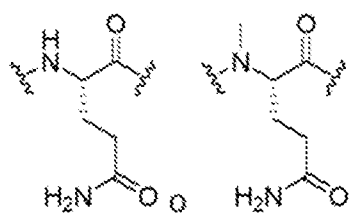
en donde i es un número entero de 0 a 24, y $X = \text{Br}$, I o Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, o $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;
 Z_{23} es S o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



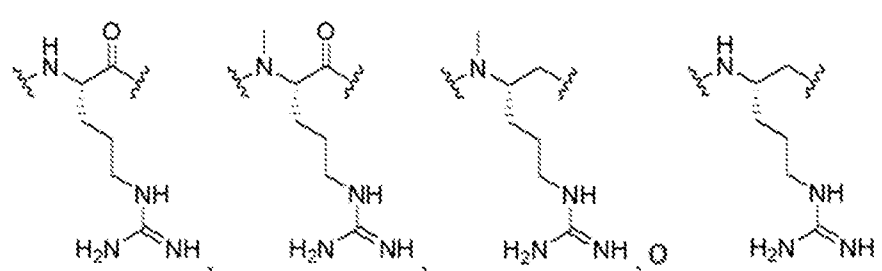
en donde i es un número entero de 0 a 24, y $X = \text{Br}$, I o Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, o $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;
 Z_{26} es A o H;
 Z_{30} es L o K, donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



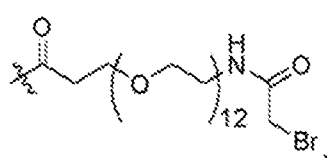
Z_{34} es



y
 Z_{35} es

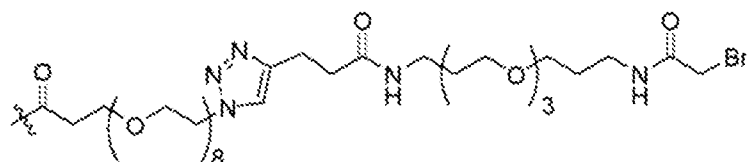
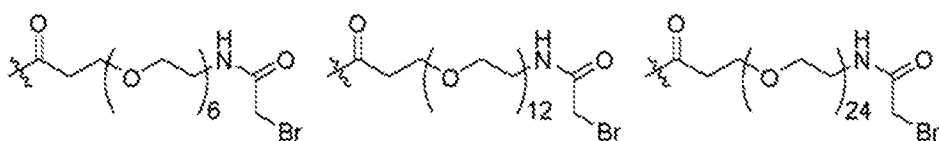


[0012] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde: p es 0 o 1;
 m es 0, 1, 2, 3 o 5;
 n es 1, 2 o 4;
 q es 0 o 1; siempre que q pueda ser 1 solo cuando Z_{30} esté ausente;
 PUENTE es $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{triazolil}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ o $-\text{CH}_2\text{S}-$;
 Z_4 es K, A, E, S o R;
 Z_7 es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



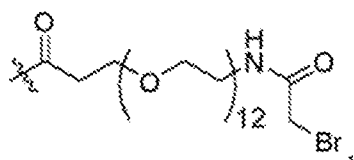
Z₉ es G o K,

Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con

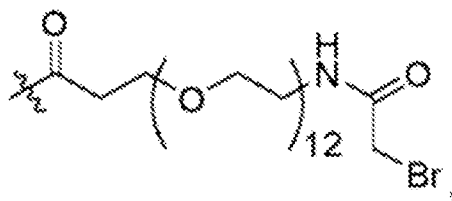


-C(O)CH₂Br,

Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



Z₂₃ es S o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con

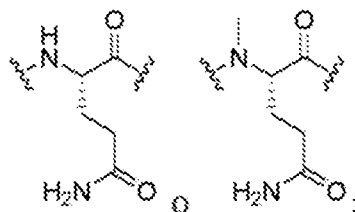


Z₂₆ es A o H,

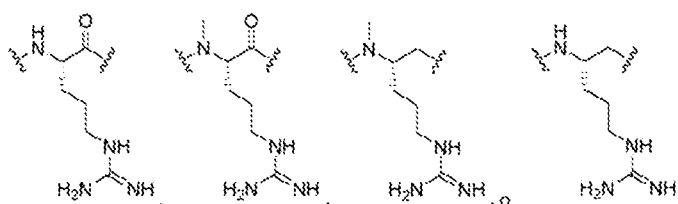
Z₃₀ es L o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



Z₃₄ es



Z₃₅ es



[0013] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 73-100 y 147-156, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0014] En ciertas formas de realización, el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo está unido covalentemente al péptido PYY cíclico en un residuo de lisina del péptido PYY cíclico a través de un enlazador. El enlazador puede, por ejemplo, comprender un enlazador seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG)8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4, una cadena de PEG de 2-24 unidades de PEG, una cadena de alquilo que contiene 2-10 átomos de carbono, (Gly₄Ser)_j donde j = 1-4, (AlaPro)_u donde u = 1-10, y un enlace.

[0015] En ciertas formas de realización, solo uno de Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ y Z₂₃ en la Fórmula I es lisina, y la lisina está unida covalentemente a un residuo de cisteína diseñado del anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo a través del conector.

[0016] En ciertas formas de realización, el conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 102-127 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

[0017] En ciertas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 137, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 139. En ciertas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende además una porción Fc. En ciertas formas de realización, el anticuerpo monoclonal aislado comprende una cadena pesada (HC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 138 y una cadena ligera (LC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 140.

[0018] También se proporcionan conjugados que comprenden un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo acoplado a un péptido PYY cíclico, en donde el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), LCDR2, y LCDR3, que tienen las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145, y 146, respectivamente, preferiblemente el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 137, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 139, y más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal es una cadena pesada (HC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 138, y una cadena ligera (LC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 140; el péptido PYY cíclico comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 73-100 y 147-156, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con el péptido PYY cíclico en el residuo 7, 9, 11, 22 o 23 del péptido PYY cíclico, preferiblemente en el residuo de lisina 11 del péptido PYY cíclico, directamente o a través de un enlazador.

[0019] También se proporcionan métodos para producir los conjugados de la invención. Los métodos comprenden hacer reaccionar un electrófilo, preferiblemente bromoacetamida o maleimida, introducido en una cadena lateral del péptido PYY cíclico, preferiblemente la cadena lateral de un residuo de lisina del péptido PYY cíclico, con el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína de SEQ ID NO: 143 del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo, creando de este modo un enlace covalente entre el péptido PYY cíclico y el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo.

[0020] También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0021] También se proporcionan composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia alterada a la glucosa, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema. Los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de las composiciones farmacéuticas de la invención.

[0022] También se proporcionan composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos de reducción de la ingesta de alimentos en un sujeto que lo necesita. Los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

[0023] También se proporcionan composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en métodos de modulación de la actividad del receptor Y2 en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

[0024] En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra mediante una inyección. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra en combinación con al menos un agente antidiabético. El agente antidiabético puede ser, por ejemplo, un modulador del receptor del péptido 1 similar al glucagón. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra en combinación con liraglutida.

[0025] También se proporcionan kits que comprenden los conjugados de la invención, que preferiblemente comprenden además una liraglutida y un dispositivo para inyección.

[0026] También se proporcionan métodos para producir las composiciones farmacéuticas de la invención. Los métodos comprenden combinar el conjugado con un vehículo farmacéuticamente aceptable para obtener la composición farmacéutica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027]

Fig. 1: Muestra una estrategia general de conjugación de péptido-mAb de acuerdo con una forma de realización de la invención. X representa un electrófilo introducido en una cadena lateral de un péptido terapéutico, tal como bromoacetamida o maleimida, que reacciona en un sitio específico con el grupo sulfhidrido del residuo de Cys diseñado en un CDR de un mAb que extiende la vida media, creando un enlace covalente entre el péptido y el mAb.

Fig. 2: Resumen de los residuos de CDR seleccionados para la sustitución en PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129) y en PH9L3_VL (SEQ ID NO: 128). Los residuos sustituidos con Cys están en negrita y subrayados.

Fig. 3: Farmacocinética del compuesto 1 en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO).

Fig. 4: Farmacocinética del compuesto 1 en monos cynomolgus.

Fig. 5: Ingesta de alimentos en ratones DIO tratados con el compuesto 1: dosificación aguda.

Fig. 6: Pérdida de peso en ratones DIO tratados con el compuesto 1: dosificación aguda.

Fig. 7: Ingesta de alimentos en ratones DIO tratados con el compuesto 1: dosificación crónica.

Fig. 8: Pérdida de peso en ratones DIO tratados con el compuesto 1: dosificación crónica.

Fig. 9: Pérdida de peso en ratones DIO tratados con el compuesto 1 en combinación con liraglutida: dosificación crónica.

Fig. 10: Muestra un gráfico que demuestra la ingesta de alimentos semanal promedio durante 3 semanas antes de comenzar con liraglutida, 1 semana de tratamiento con liraglutida y 2 semanas después de la administración de liraglutida. Se indica la reducción porcentual de la ingesta de alimentos semanal promedio del tratamiento frente al promedio inicial de 3 semanas.

Figs. 11A-11D: Muestra gráficos que demuestran el efecto del compuesto 1 con adición de liraglutida sobre la glucosa, la insulina y los triglicéridos en macacos rhesus obesos. La Fig. 11A muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de glucosa. La Fig. 11B muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de insulina. La Fig. 11C muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre HOMA-IR. La Fig. 11D muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de triglicéridos.

Figs. 12A-12D: Muestran gráficos del efecto del compuesto 1 con adición de liraglutida sobre el colesterol y las enzimas hepáticas en macacos rhesus obesos. La figura 12A muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de colesterol. La figura 12B muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de HDL. La figura 12C muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de ALT. La figura 12D muestra un gráfico que demuestra el efecto de la monoterapia con el compuesto 1 (PYY) y la terapia combinada con liraglutida (PYY+Lira) sobre los niveles de AST.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0028] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. De lo contrario, ciertos términos utilizados en el presente documento tienen los significados que se establecen en la especificación.

[0029] Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- [0030]** A menos que se indique lo contrario, cualquier valor numérico, como una concentración o un rango de concentración descritos en el presente documento, se debe entender que se modifica en todos los casos por el término "aproximadamente". Por lo tanto, un valor numérico incluye típicamente $\pm 10\%$ del valor indicado. Por ejemplo, una concentración de 1 mg/mL incluye de 0,9 mg/mL a 1,1 mg/mL. Asimismo, un rango de concentración de 1 % a 10 % (p/v) incluye de 0,9 % (p/v) a 11 % (p/v). Tal como se utiliza en el presente documento, el uso de un rango numérico incluye expresamente todos los subrangos posibles, todos los valores numéricos individuales dentro de ese rango, incluidos los números enteros dentro de dichos rangos y las fracciones de los valores a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- [0031]** A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos se debe entender que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes queden abarcados por la invención.
- [0032]** Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "tiene", "que tiene", "contiene" o "que contiene", o cualquier otra variación de los mismos, se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros, y se pretende que sean no excluyentes o abiertos. Por ejemplo, una composición, una mezcla, un proceso, un método, un artículo o un aparato que comprende una lista de elementos no se limita necesariamente a solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no expresamente enumerados o inherentes a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario, "o" se refiere a un "o" inclusivo y no a un "o" exclusivo. Por ejemplo, una condición A o B se satisface por cualquiera de las siguientes: A es verdadero (o está presente) y B es falso (o no está presente), A es falso (o no está presente) y B es verdadero (o está presente), y tanto A como B son verdaderos (o están presentes).
- [0033]** También debe entenderse que los términos "aproximadamente", "generalmente", "sustancialmente" y términos similares, utilizados en el presente documento cuando se hace referencia a una dimensión o característica de un componente de la invención preferida, indican que la dimensión/característica descrita no es un límite o parámetro estricto y no excluye variaciones menores de la misma que sean funcionalmente iguales o similares, como lo entendería una persona con conocimientos ordinarios en la materia. Como mínimo, dichas referencias que incluyen un parámetro numérico incluirían variaciones que, utilizando principios matemáticos e industriales aceptados en la técnica (por ejemplo, redondeo, errores de medición u otros errores sistemáticos, tolerancias de fabricación, etc.), no variarían el dígito menos significativo.
- [0034]** Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas (por ejemplo, secuencias polipeptídicas PYY₃₋₃₆ cíclicas, secuencias de cadena ligera o cadena pesada de anticuerpos), se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual utilizando métodos conocidos en la técnica en vista de la presente divulgación.
- [0035]** Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.
- [0036]** La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, FM Ausubel et al., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1995) (Ausubel)).
- [0037]** Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica).
- [0038]** Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo de forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente

sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren únicamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación.

5 **[0039]** Tal como se utiliza en el presente documento, "sujeto" significa cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. El término "mamífero", tal como se utiliza en el presente documento, abarca cualquier mamífero. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, vacas, caballos, ovejas, cerdos, gatos, perros, ratones, ratas, conejos, cobayas, monos, seres humanos, etc., más preferiblemente un ser humano.

10 **[0040]** El término "administrar" con respecto a los métodos de la invención, significa un método para prevenir, tratar o mejorar terapéutica o profilácticamente un síndrome, trastorno o enfermedad como se describe en este documento mediante el uso de un conjugado de la invención o una forma, composición o medicamento del mismo. Dichos métodos incluyen administrar una cantidad eficaz de dicho conjugado, una forma, composición o medicamento del mismo en diferentes momentos durante el curso de una terapia o simultáneamente en una forma de combinación. Se debe entender
15 que los métodos de la invención abarcan todos los regímenes de tratamiento terapéutico conocidos.

[0041] El término "cantidad efectiva" significa la cantidad de conjugado activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejido, animal o humano, que busca un investigador, veterinario, médico u otro clínico, lo que incluye prevenir, tratar o mejorar un síndrome, trastorno o enfermedad que se está tratando, o los síntomas de un síndrome, trastorno o enfermedad que se está tratando.

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

25 **[0043]** Como se utiliza en el presente documento, el término "acoplado" se refiere a la unión o conexión de dos o más objetos entre sí. Cuando se hace referencia a compuestos químicos o biológicos, acoplado puede referirse a una conexión covalente entre los dos o más compuestos químicos o biológicos. A modo de ejemplo no limitativo, un anticuerpo de la invención se puede acoplar con un péptido de interés para formar un péptido acoplado a anticuerpo. Un péptido acoplado
30 a anticuerpo se puede formar a través de reacciones químicas específicas diseñadas para conjugarse el anticuerpo con el péptido. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención se puede acoplar covalentemente con un péptido de la invención a través de un enlazador. El enlazador puede, por ejemplo, primero conectarse covalentemente al anticuerpo o al péptido, luego conectarse covalentemente al péptido o al anticuerpo.

35 **[0044]** Como se utiliza en el presente documento, el término "enlazador" se refiere a un módulo químico que comprende una cadena covalente o atómica que une covalentemente un anticuerpo al péptido. El enlazador puede, por ejemplo, incluir, pero no se limita a, un enlazador peptídico, un enlazador de hidrocarburo, un enlazador de polietilenglicol (PEG), un enlazador de polipropilenglicol (PPG), un enlazador de polisacárido, un enlazador de poliéster, un enlazador híbrido que consiste en PEG y un heterociclo incorporado, y una cadena de hidrocarburo.

40 **[0045]** Como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo acoplado covalentemente a una fracción farmacéuticamente activa. El término "conjugado a" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención unido covalentemente a o conectado covalentemente a una fracción farmacéuticamente activa, preferiblemente un péptido terapéutico, directa o indirectamente a través de un enlazador. A modo de ejemplo no limitativo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal de la invención y la fracción farmacéuticamente activa puede ser un péptido terapéutico, tal como un péptido PYY cíclico de interés.

45 **[0046]** Las secuencias de péptidos descritas en este documento se escriben de acuerdo con la convención habitual según la cual la región N-terminal del péptido está a la izquierda y la región C-terminal está a la derecha. Aunque se conocen formas isoméricas de los aminoácidos, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente lo contrario.

Anticuerpos

55 **[0047]** En un aspecto general, la invención se refiere a un nuevo anticuerpo, que ha sido diseñado para no ser dirigido a una diana y para contener un residuo de cisteína capaz de ser utilizado para conjugarse químicamente (es decir, acoplar) una fracción farmacéuticamente activa, tal como un péptido terapéutico (por ejemplo, un péptido PYY cíclico), de una manera específica del sitio, de modo que el péptido acoplado al anticuerpo tiene una vida media extendida/aumentada en comparación con el péptido solo. Como se utiliza en el presente documento, el término "no dirigido a una diana" en el
60 contexto de un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que no se une específicamente a ninguna diana *in vivo*. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente a una diana" se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno diana, con una KD de 1×10^{-8} M o menos, preferiblemente 5×10^{-9} M o menos, 1×10^{-9} M o menos, 5×10^{-10} M o menos, o 1×10^{-10} M o menos. El término "KD" se refiere a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación entre Kd y Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos en la técnica en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, la
65 KD de un anticuerpo se puede determinar utilizando resonancia de plasmón de superficie, como por ejemplo utilizando un

sistema de biosensor, por ejemplo, un sistema Biacore®, o utilizando tecnología de interferometría de biocapa, como un sistema Octet RED96. Cuanto menor sea el valor de la KD de un anticuerpo, mayor será la afinidad con la que el anticuerpo se une a un antígeno objetivo.

[0048] Los anticuerpos monoclonales, completos o un fragmento de los mismos, se pueden utilizar como una fracción que prolonga la vida media. Los anticuerpos monoclonales son proteínas bien estudiadas que se han utilizado y caracterizado para usos *in vivo* y, como tales, los mecanismos que permiten su vida media prolongada *in vivo* y los mecanismos para su eliminación *in vivo* se entienden bien. Además, la separación espacial y la presentación de los dos "brazos" del anticuerpo monoclonal pueden ser ventajosas para la presentación bivalente eficaz de una fracción terapéutica (es decir, un péptido terapéutico). Se han desarrollado terapias en las que las toxinas u otros fármacos de moléculas pequeñas se unen químicamente a un anticuerpo monoclonal, pero normalmente utilizan un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno específico y dirige el conjugado anticuerpo-fármaco a un tejido/célula de interés, que expresa preferentemente el antígeno, y normalmente el fármaco/molécula pequeña se une al anticuerpo de una manera que no afecta a la unión del anticuerpo al antígeno.

[0049] Para los conjugados de péptido terapéutico-mAb, no se desea la unión específica de antígeno por el anticuerpo monoclonal que extiende la vida media. Debido a esto, se utiliza un par de dominios variables (V) de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) que no se espera que se unan específicamente a ningún objetivo para preparar el anticuerpo monoclonal no dirigido, habilitado por acoplamiento, de la invención. Para obtener un anticuerpo monoclonal no dirigido, habilitado por acoplamiento, se introduce un residuo de cisteína en una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no dirigido seleccionado. La fracción farmacéuticamente activa (por ejemplo, péptido/compuesto terapéutico) puede contener la fracción química apropiada para permitir la conjugación de la fracción farmacéuticamente activa con el residuo de cisteína diseñado del anticuerpo monoclonal no dirigido. En la Figura 1 se muestra una estrategia general de conjugación de péptido-anticuerpo monoclonal de acuerdo con una forma de realización de la invención.

[0050] El término "anticuerpos" como se utiliza en este documento se entiende en un sentido amplio e incluye anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, murinos, de rata), humanos, adaptados a humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos y anticuerpos de cadena sencilla.

[0051] Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, a saber, kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden contener un dominio constante de cadena ligera kappa o lambda. De acuerdo con formas de realización particulares, los anticuerpos de la invención incluyen regiones constantes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos de ratón o humanos. Además de los dominios constantes pesados y ligeros, los anticuerpos contienen una región de unión al antígeno que está formada por una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, cada una de las cuales contiene tres dominios (es decir, regiones determinantes de complementariedad 1-3; (CDR1, CDR2 y CDR3)). Los dominios de la región variable de cadena ligera se denominan alternativamente LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y los dominios de la región variable de cadena pesada se denominan alternativamente HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

[0052] Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales, a saber, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. La IgG es la más estable de los cinco tipos de inmunoglobulinas, y tiene una vida media en suero en humanos de aproximadamente 23 días. La IgA y la IgG se subclasifican además como los isotipos IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cada una de las cuatro subclases de IgG tiene diferentes funciones biológicas conocidas como funciones efectoras. Estas funciones efectoras están mediadas generalmente a través de la interacción con el receptor Fc (Fc γ R) o mediante la unión de C1q y la fijación del complemento. La unión a Fc γ R puede conducir a la citólisis mediada por células dependiente de anticuerpos, mientras que la unión a factores del complemento puede conducir a la lisis celular mediada por el complemento. Un anticuerpo de la invención utilizado por su capacidad para extender la vida media de un péptido terapéutico no tiene función efectora o tiene una función efectora mínima, pero conserva su capacidad para unirse a FcRn, cuya unión puede ser un medio primario por el cual los anticuerpos tienen una vida media *in vivo* extendida.

[0053] En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de genes V de línea germinal de Ig completamente humanas, y una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de genes V de línea germinal de Ig completamente humanas excepto HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une específicamente a ningún antígeno humano *in vivo*. En ciertas formas de realización, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene secuencias de genes V de línea germinal de Ig completamente humanas, y una región variable de cadena pesada que tiene secuencias de genes V de línea germinal de Ig completamente humanas excepto HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y una fracción farmacéuticamente activa (por ejemplo, un péptido PYY cíclico de la invención) conjugada a la misma, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une específicamente a ningún antígeno humano *in vivo*. En la presente divulgación, con respecto a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo

con una forma de realización de la invención, la frase "un conjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y una fracción farmacéuticamente activa conjugada al mismo" se usa indistintamente con la frase "un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado con una fracción farmacéuticamente activa".

5 **[0054]** Como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de anticuerpo tal como, por ejemplo, un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado por disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂, un dsFv biespecífico (dsFvdsFv'), un diacuerpo estabilizado por disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de dominio sencillo (sdab), un dímero de scFv (diacuerpo bivalente), un anticuerpo multiespecífico formado a partir de una porción de un anticuerpo que
10 comprende una o más CDR, un anticuerpo de dominio sencillo camelizado, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de dominio bivalente o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero que no comprenda una estructura de anticuerpo completa. Un fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse al mismo antígeno al que se une el anticuerpo parental o un fragmento de anticuerpo parental. Según formas de realización particulares, el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera, una región constante de
15 cadena ligera y un segmento Fd (es decir, una porción de la cadena pesada que está incluida en el fragmento Fab). Según otras formas de realización particulares, el fragmento de unión al antígeno comprende Fab y F(ab').

[0055] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo de cadena única" se refiere a un anticuerpo de cadena única convencional en el campo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de
20 cadena ligera conectadas por un péptido corto de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 aminoácidos. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo de dominio único" se refiere a un anticuerpo de dominio único convencional en el campo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada o que comprende solo una región variable de cadena pesada.

[0056] La frase "anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que
25 está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno diana está sustancialmente libre de anticuerpos que no se unen específicamente al antígeno diana). Además, un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

[0057] Una región variable de anticuerpo consiste en una región "marco" interrumpida por tres "sitios de unión al antígeno". Los sitios de unión al antígeno se definen utilizando varios términos: (i) Regiones determinantes de complementariedad (CDR), tres en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), que se basan en la variabilidad de la secuencia (Wu y Kabat J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1991). (ii) "Regiones hipervariables", "HVR" o "HV", tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3), se refieren a las regiones de los dominios variables de un anticuerpo que son hipervariables en estructura según lo definido por Chothia y Lesk (Chothia y Lesk Mol Biol
35 196:901-17, 1987). Otros términos incluyen "IMGTCDRs" (Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003) y "Uso de residuos determinantes de especificidad" (SDRU) (Almagro Mol Recognit 17:132-43, 2004). La base de datos International ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_mgt_org) proporciona una numeración y definición estandarizadas de los sitios de unión al antígeno. La correspondencia entre las delineaciones de CDR, HV e IMGT se describe en Lefranc et al., Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003.

[0058] "Marco estructural" o "secuencias de marco estructural" son las secuencias restantes de una región variable
45 distintas de las definidas como sitios de unión al antígeno. Debido a que los sitios de unión al antígeno pueden definirse mediante diversos términos como se describió anteriormente, la secuencia exacta de aminoácidos de un marco estructural depende de cómo se definió el sitio de unión al antígeno.

[0059] En la invención reivindicada, el anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que tiene las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145 y SEQ ID NO: 146, respectivamente, y una región variable de cadena pesada que tiene las HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 143, respectivamente.

[0060] En otra forma de realización, el anticuerpo aislado comprende además una región Fc derivada de la región Fc de IgG4 humana. La región Fc de IgG4 humana tiene una capacidad reducida para unirse a FcγR y factores del complemento en comparación con otros subtipos de IgG. Preferiblemente, la región Fc contiene una región Fc de IgG4 humana que tiene sustituciones que eliminan la función efectora. Por lo tanto, un anticuerpo aislado comprende además una región Fc que tiene una región Fc de IgG4 humana modificada que contiene una o más de las siguientes sustituciones: sustitución de prolina por glutamato en el residuo 233, alanina o valina por fenilalanina en el residuo 234 y alanina o glutamato por leucina en el residuo 235 (numeración EU, Kabat, EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. US Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242). La eliminación del sitio de glicosilación ligado a N en la región Fc de IgG4 sustituyendo Ala por Asn en el residuo 297 (numeración EU) es otra forma de asegurar que se elimine la actividad efectora residual.

[0061] Preferentemente, un anticuerpo de la invención existe como dímeros unidos entre sí por enlaces disulfuro y diversas interacciones no covalentes. Por lo tanto, la porción Fc útil para el anticuerpo de la invención puede ser la región Fc de IgG4 humana que contiene una sustitución, tal como serina por prolina en la posición 228 (numeración EU), que estabiliza la formación de dímeros de cadena pesada y evita la formación de medias cadenas Fc de IgG4.

[0062] En otra forma de realización, se elimina el residuo de Lys C-terminal en la cadena pesada, como se observa comúnmente en los anticuerpos monoclonales producidos de forma recombinante.

[0063] "Anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera en las que tanto el marco como los sitios de unión al antígeno se derivan de secuencias de origen humano. Si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de origen humano.

[0064] El anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que se "derivan de" secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana o de inmunoglobulina reorganizada. Dichos sistemas incluyen bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana que se muestran en fagos y animales no humanos transgénicos, como ratones que portan loci de inmunoglobulina humana, como se describe en el presente documento. El "anticuerpo humano" puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o reorganizada debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas de ocurrencia natural o a la introducción intencional de sustituciones en el marco o en los sitios de unión del antígeno. Normalmente, un "anticuerpo humano" es al menos aproximadamente un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina reordenado o de línea germinal humana. En algunos casos, un "anticuerpo humano" puede contener secuencias de consenso derivadas de análisis de secuencias de consenso humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000), o HCDR3 sintético incorporado en bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana que se muestran en fagos, por ejemplo, como se describe en Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 y la publicación de patente internacional n.º WO2009/085462). Los anticuerpos en los que los sitios de unión a antígeno se derivan de una especie no humana no se incluyen en la definición de "anticuerpo humano".

[0065] Los anticuerpos humanizados aislados pueden ser sintéticos. Los anticuerpos humanos, aunque se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana, pueden generarse utilizando sistemas como la visualización de fagos que incorporan CDR sintéticos y/o estructuras sintéticas, o pueden someterse a mutagénesis in vitro para mejorar las propiedades de los anticuerpos, lo que da como resultado anticuerpos que no existen de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[0066] El término "anticuerpo recombinante" como se utiliza en el presente documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN, o anticuerpos que se generan in vitro utilizando el intercambio de brazos Fab.

[0067] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden elaborar mediante el método de hibridoma, tecnología de presentación en fagos, tecnología de clonación de genes de linfocito único o mediante métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, como un ratón o una rata transgénicos, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera.

[0068] En ciertas formas de realización, el término "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende SEQ ID NO: 137 y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende SEQ ID NO: 139. En ciertas formas de realización, el mAb es un anticuerpo monoclonal completamente humano que tiene una secuencia de cadena pesada (HC) que comprende SEQ ID NO: 138 y una secuencia de cadena ligera (LC) que comprende SEQ ID NO: 140. En ciertas formas de realización, el residuo de lisina en la posición 446 de SEQ ID NO: 138 está opcionalmente ausente.

[0069] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. La región variable de las cadenas ligera y pesada a menudo corresponde a la región variable de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes corresponden a las secuencias de un anticuerpo derivado de otra especie de mamífero (por ejemplo, ser humano) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

[0070] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítipo o comprende secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítipo o comprende secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida, y en donde el primer y/o segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen opcionalmente una fracción farmacéuticamente activa conjugada (por ejemplo, un péptido terapéutico). En una forma de realización, el primer y segundo epítipos están en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una forma de realización, el primer y segundo epítipos se superponen o se superponen sustancialmente. En una forma de realización, el primer y segundo epítipos no se superponen o no se superponen sustancialmente. En una forma de realización, el primer y segundo epítipos están en diferentes antígenos, por ejemplo, las diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una forma de realización, el primer y segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen la misma fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, el primer y segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen diferentes fracciones farmacéuticamente activas. En una forma de realización, solo el primer dominio variable de inmunoglobulina incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, solo el segundo dominio variable de inmunoglobulina incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, un anticuerpo multiespecífico comprende un tercer, cuarto o quinto dominio variable de inmunoglobulina. En una forma de realización, un anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico o una molécula de anticuerpo tetraespecífico.

[0071] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo multiespecífico que se une a no más de dos epítipos o dos antígenos y/o comprende dos fracciones farmacéuticamente activas conjugadas (por ejemplo, la misma fracción farmacéuticamente activa o diferente). Un anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo o comprende secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo o comprende secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida, y en donde el primer y/o segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen opcionalmente una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, el primer y segundo epítipos están en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una forma de realización, el primer y segundo epítipos se superponen o se superponen sustancialmente. En una forma de realización, el primer y segundo epítipos están en diferentes antígenos, por ejemplo, las diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una forma de realización, el primer y segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen la misma fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, el primer y segundo dominio variable de inmunoglobulina incluyen diferentes fracciones farmacéuticamente activas. En una forma de realización, solo el primer dominio variable de inmunoglobulina incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, solo el segundo dominio variable de inmunoglobulina incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, un anticuerpo biespecífico comprende una primera secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítipo o comprenden secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida y una segunda secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítipo o comprenden secuencias de línea germinal que carecen de cualquier especificidad de unión conocida, y en donde el primer y/o segundo dominio variable de cadena pesada incluyen opcionalmente una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, el primer y el segundo dominio variable de cadena pesada incluyen la misma fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, el primer y el segundo dominio variable de cadena pesada incluyen diferentes fracciones farmacéuticamente activas conjugadas. En una forma de realización, solo el primer dominio variable de cadena pesada incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada. En una forma de realización, solo el segundo dominio variable de cadena pesada incluye una fracción farmacéuticamente activa conjugada.

[0072] "Anticuerpo de longitud completa" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa y dos cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa. Una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa (HC) consta de dominios variables y constantes de cadena pesada bien conocidos VH, CH1, CH2 y CH3. Una cadena ligera de anticuerpo de longitud completa (LC) consta de dominios variables y constantes de cadena ligera bien conocidos VL y CL. El anticuerpo de longitud completa puede carecer de la lisina C-terminal (K) en una o ambas cadenas pesadas.

[0073] El término "brazo Fab" o "media molécula" se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera que se une específicamente a un antígeno.

[0074] Los anticuerpos biespecíficos de longitud completa se pueden generar, por ejemplo, utilizando el intercambio de brazos Fab (o intercambio de media molécula) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos mediante la introducción de sustituciones en la interfaz CH3 de la cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímeros de dos medias moléculas de anticuerpo que tienen una especificidad distinta, ya sea *in vitro* en un entorno libre de células o utilizando la coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de

isomerización de enlaces disulfuro y disociación-asociación de dominios CH3. Los enlaces disulfuro de la cadena pesada en las regiones de bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre cadenas pesadas con residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y, simultáneamente, los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y reforman mediante disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab se pueden diseñar para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas que pueden unirse cada una a un epítopo distinto.

[0075] "Homodimerización", como se utiliza en el presente documento, con respecto a los anticuerpos, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos CH3 idénticas. "Homodímero", como se utiliza en el presente documento, con respecto a los anticuerpos, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos CH3 idénticas.

[0076] "Heterodimerización" como se utiliza en el presente documento, con respecto a los anticuerpos, se refiere a una interacción de dos cadenas pesadas que tienen secuencias de aminoácidos CH3 no idénticas. "Heterodímero" como se utiliza en el presente documento, con respecto a los anticuerpos, se refiere a un anticuerpo que tiene dos cadenas pesadas con secuencias de aminoácidos CH3 no idénticas.

[0077] La estrategia de "perilla en agujero" (véase, por ejemplo, Publ. Intl. PCT N.º WO 2006/028936) se puede utilizar para generar anticuerpos biespecíficos de longitud completa. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfaz de los dominios CH3 en IgG humana se pueden mutar en posiciones que afectan las interacciones del dominio CH3 para promover la formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (agujero) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (perilla) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un "agujero" con la cadena pesada con una "perilla". Los pares de sustitución CH3 ejemplares que forman un botón y un agujero son (expresados como posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S_L368A_Y407V.

[0078] Se pueden utilizar otras estrategias, como promover la heterodimerización de la cadena pesada mediante interacciones electrostáticas sustituyendo residuos cargados positivamente en una superficie CH3 y residuos cargados negativamente en una segunda superficie CH3, como se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º US2010/0015133; la publicación de patente de EE. UU. n.º US2009/0182127; la publicación de patente de EE. UU. n.º US2010/028637 o la publicación de patente de EE. UU. n.º US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse mediante las siguientes sustituciones (expresadas como posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, o T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W como se describe en la publicación de patente de EE. UU. n.º US2012/0149876 o en la publicación de patente de EE. UU. n.º US2013/0195849.

[0079] Además de los métodos descritos anteriormente, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar *in vitro* en un entorno libre de células introduciendo mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos y formando el anticuerpo heterodimérico biespecífico a partir de dos anticuerpos homodiméricos monoespecíficos parentales en condiciones reductoras para permitir la isomerización del enlace disulfuro de acuerdo con los métodos descritos en la publicación de patente internacional n.º WO2011/131746. En los métodos, el primer anticuerpo bivalente monoespecífico y el segundo anticuerpo bivalente monoespecífico se diseñan para tener ciertas sustituciones en el dominio CH3 que promueven la estabilidad del heterodímero; los anticuerpos se incuban juntos en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten la isomerización del enlace disulfuro; generando así el anticuerpo biespecífico mediante el intercambio del brazo Fab. Las condiciones de incubación se pueden restaurar óptimamente a no reductoras. Los agentes reductores ejemplares que se pueden utilizar son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol, preferiblemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditioneitol y tris(2-carboxietil)fosfina. Por ejemplo, se puede utilizar una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20° C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

[0080] La numeración de los residuos de aminoácidos en la región constante del anticuerpo a lo largo de la especificación se realiza de acuerdo con el índice de la UE como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), a menos que se indique explícitamente lo contrario.

65 Conjugados

[0081] En otro aspecto general, la invención se refiere a un conjugado que comprende un anticuerpo de la invención conjugado covalentemente con una fracción farmacéuticamente activa, un péptido PYY cíclico, de una manera específica del sitio, de modo que el péptido acoplado al anticuerpo tiene una vida media extendida/aumentada en comparación con el péptido solo. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas y a sus usos. Los conjugados son útiles para prevenir, tratar o mejorar enfermedades o trastornos, como obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema, entre otros.

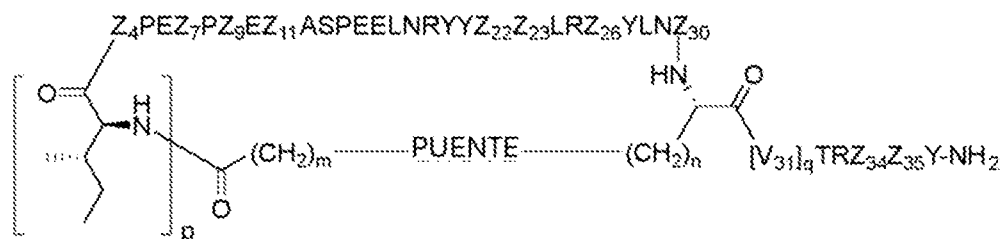
[0082] En ciertas formas de realización, el anticuerpo de la invención se modifica para comprender al menos una sustitución de residuo de cisteína que es capaz de ser conjugada con la fracción farmacéuticamente activa para extender/aumentar la vida media de la fracción farmacéuticamente activa. En ciertas formas de realización, la al menos una sustitución de residuo de cisteína está comprendida en una región determinante de complementariedad del anticuerpo. En ciertas formas de realización, la al menos una sustitución de residuo de cisteína está en una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR). En ciertas formas de realización, la al menos una sustitución de residuo de cisteína está en una HCDR3, en donde la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143. En ciertas formas de realización, el anticuerpo que comprende una HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143 tiene al menos una sustitución de cisteína adicional que es capaz de ser conjugada con una fracción farmacéuticamente activa.

[0083] En ciertas formas de realización, la fracción farmacéuticamente activa puede comprender un enlazador. El enlazador puede modificarse químicamente para permitir la conjugación del anticuerpo con la fracción farmacéuticamente activa. El enlazador puede, por ejemplo, incluir, pero no se limita a, un enlazador peptídico, un enlazador de hidrocarburo, un enlazador de polietilenglicol (PEG), un enlazador de polipropilenglicol (PPG), un enlazador de polisacárido, un enlazador de poliéster, un enlazador híbrido que consiste en PEG y un heterociclo incorporado, o una cadena de hidrocarburo. Los enlazadores de PEG pueden, por ejemplo, comprender de 2 a 24 unidades de PEG.

[0084] En ciertas formas de realización, un anticuerpo monoclonal de la invención se conjuga con uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis grupos farmacéuticamente activos (por ejemplo, péptido(s) terapéutico(s)) de interés. En formas de realización preferidas, el anticuerpo monoclonal no dirigido se conjuga con dos grupos farmacéuticamente activos de interés. En ciertas formas de realización en las que el anticuerpo monoclonal se conjuga con al menos dos grupos farmacéuticamente activos de interés, los grupos farmacéuticamente activos de interés pueden ser el mismo grupo farmacéuticamente activo o pueden ser grupos farmacéuticamente activos diferentes.

[0085] Los métodos de conjugación de anticuerpos de la invención con las fracciones farmacéuticamente activas de la invención son conocidos en la técnica. Brevemente, los anticuerpos de la invención se pueden reducir con un agente reductor (por ejemplo, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), purificar (por ejemplo, mediante adsorción de proteína A o filtración en gel) y conjugar con la fracción farmacéuticamente activa (por ejemplo, proporcionando un péptido liofilizado al anticuerpo reducido en condiciones que permitan la conjugación). Después de la reacción de conjugación, el conjugado se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) con un paso de purificación final de adsorción de proteína A. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención se pueden purificar antes de ser reducidos utilizando métodos de HIC. Para una descripción más detallada de los métodos de conjugación, véase, por ejemplo, el Ejemplo 103 y Dennler et al., *Antibodies* 4:197-224 (2015).

[0086] En los conjugados de la invención, el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

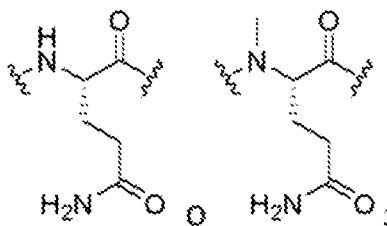


Formula I

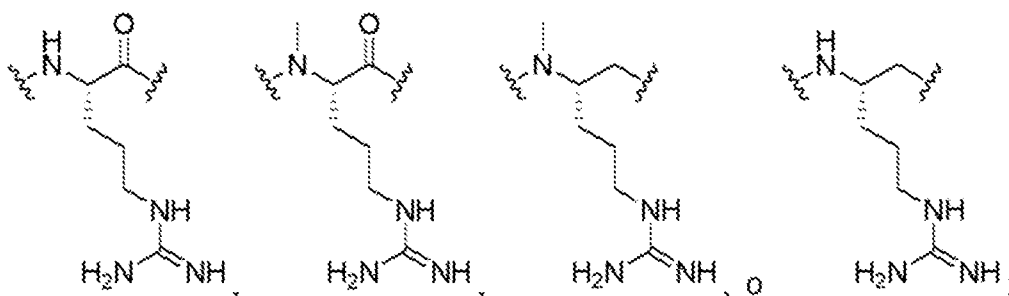
en donde

- p es 0 o 1;
- m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
- n es 1, 2, 3 o 4;
- q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ esté ausente;

PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;
 Z₄ es K, A, E, S o R;
 Z₇ es A o K;
 Z₉ es G o K;
 Z₁₁ es D o K;
 Z₂₂ es A o K;
 Z₂₃ es S o K;
 Z₂₆ es A o H;
 Z₃₀ es L, W, ausente o K; siempre que Z₃₀ esté ausente solo cuando q sea 1;
 Z₃₄ es



Z₃₅ es



donde el derivado es el compuesto de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, glicosilación, carbamilación, sulfatación, fosforilación, ciclización, lipidación y pegilación.

[0087] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico es un derivado del péptido PYY cíclico de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, lipidación y pegilación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0088] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

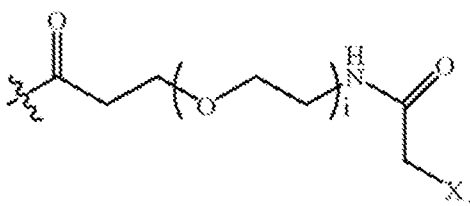
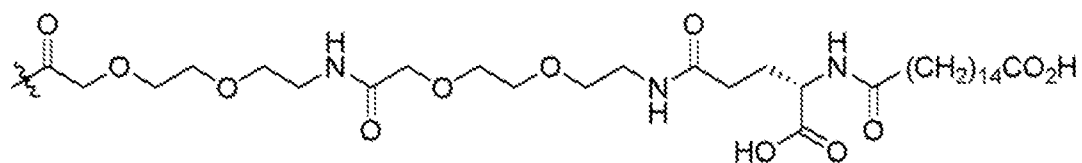
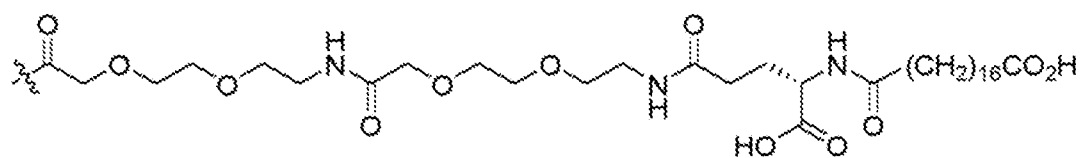
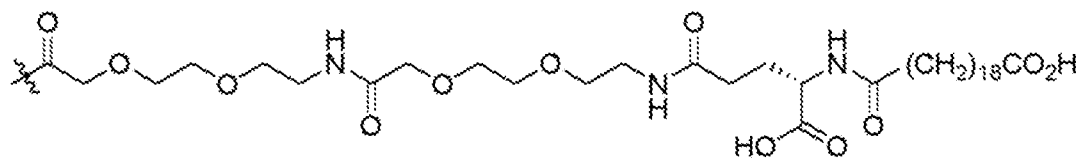
n es 1, 2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ esté ausente;

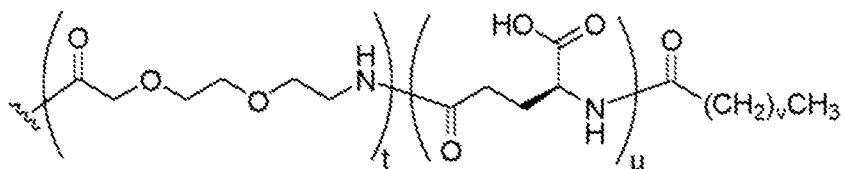
PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)-, o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S, o R;

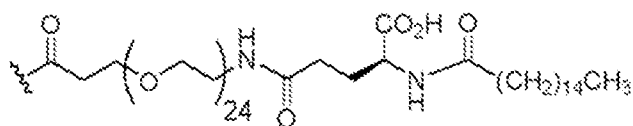
Z₇ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con

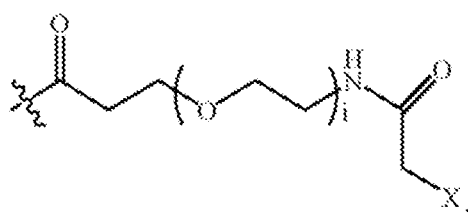
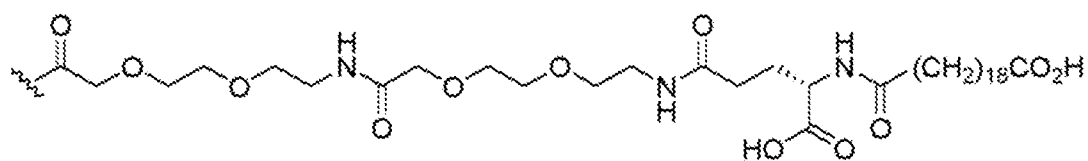
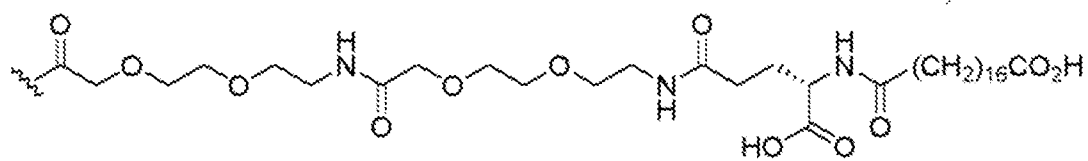
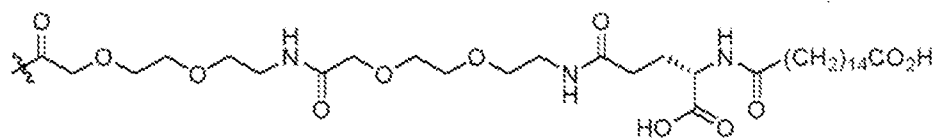
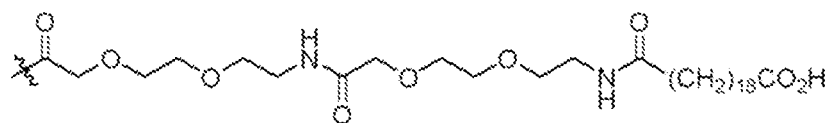
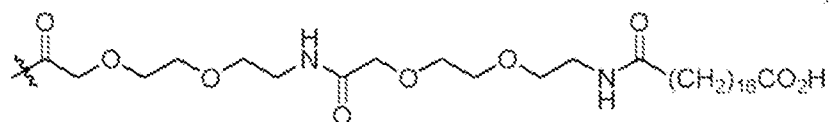
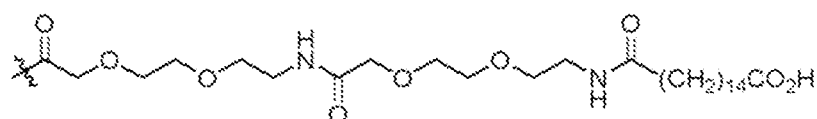
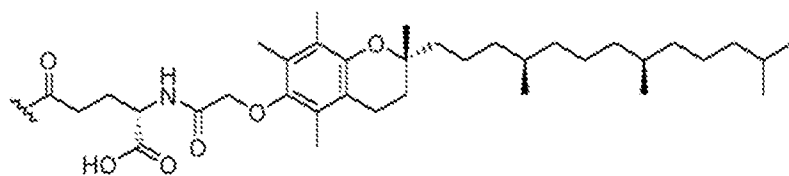
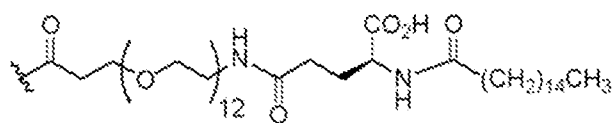


en donde i es un entero de 0 a 24, y $X = \text{Br}$, I o Cl , $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, o $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$; Z_9 es G o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con

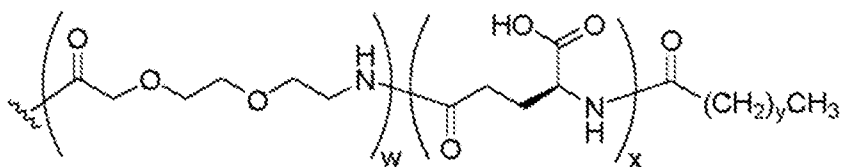


en donde t es 0, 1, o 2;
 u es 0 o 1; y
 v es 14, 16, o 18;





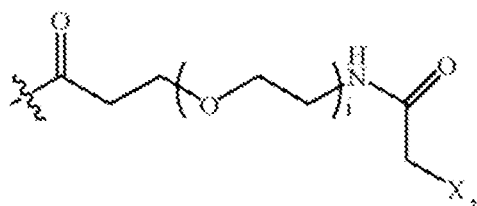
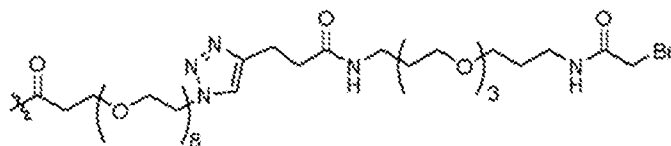
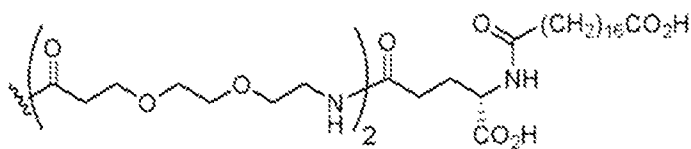
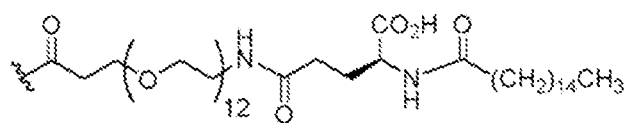
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl;
Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



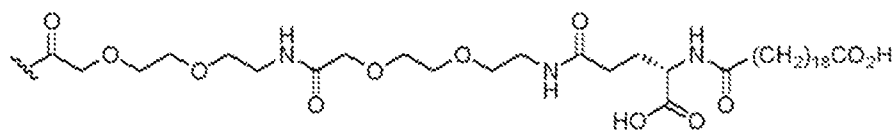
en donde w es 0, 1, 2, o 4;

x es 0 o 1; e

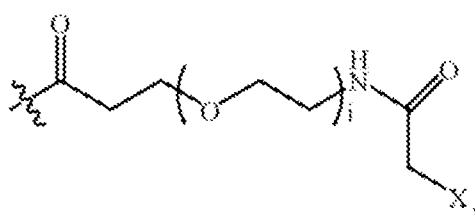
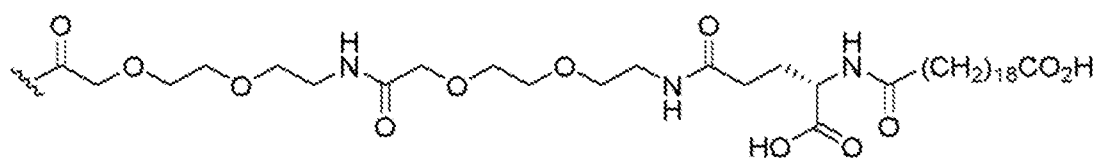
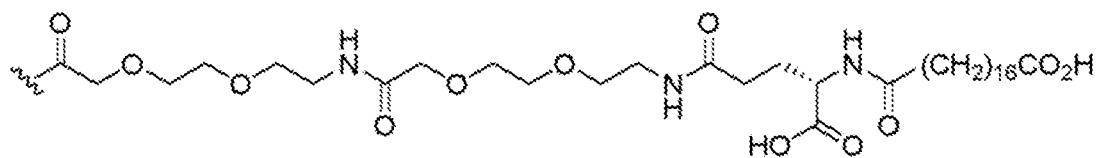
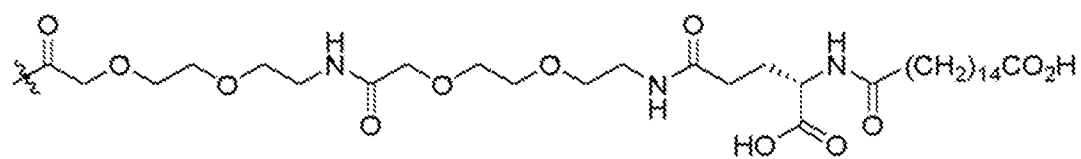
y es 14, 16, o 18;



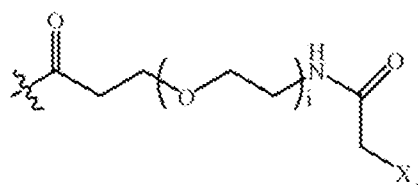
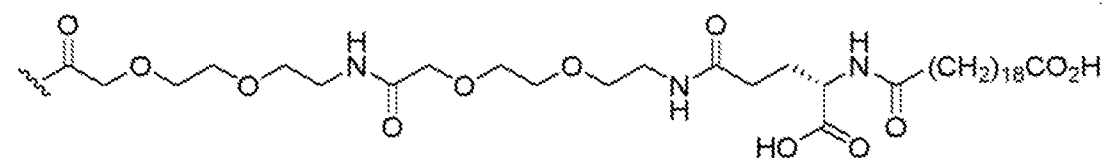
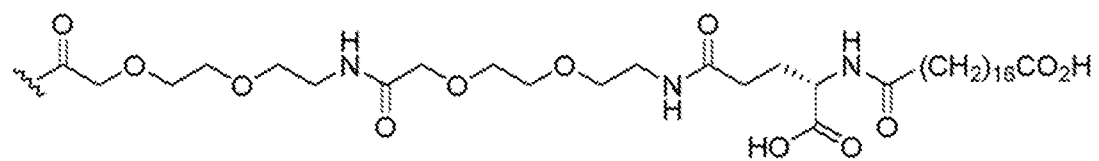
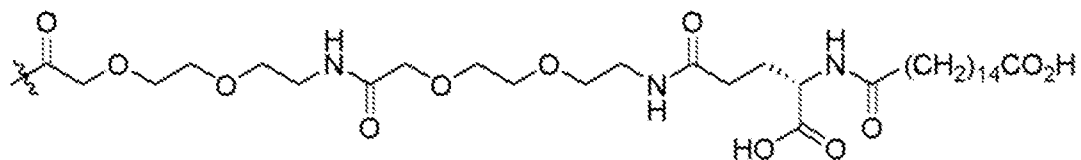
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl,



Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



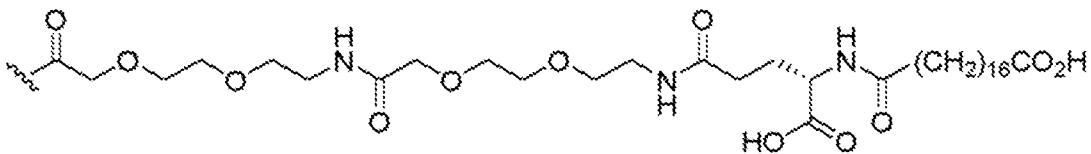
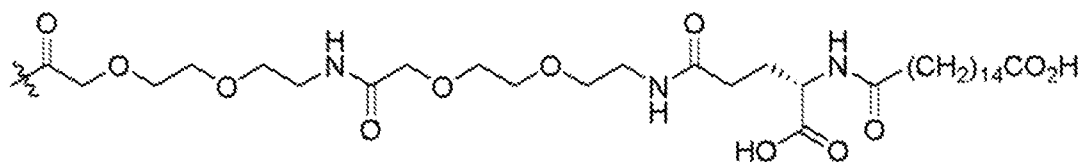
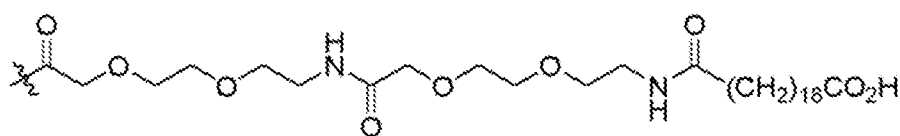
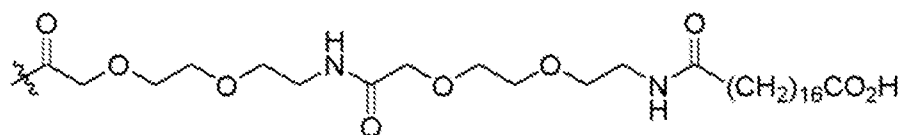
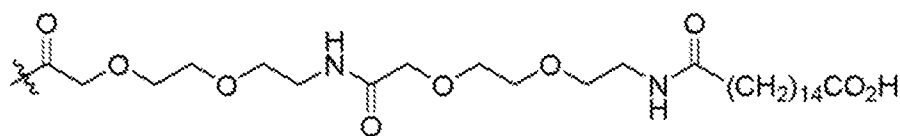
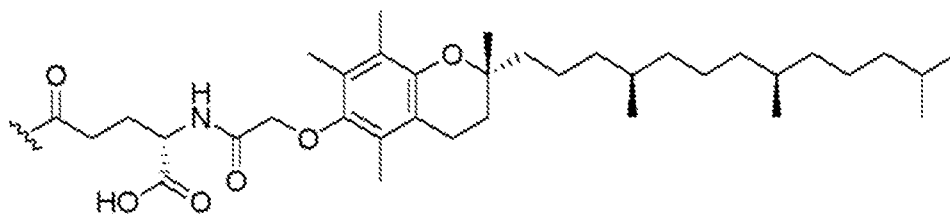
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl; Z₂₃ es S o K; en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I o -C(O)CH₂Cl;

Z₂₆ es A o H;

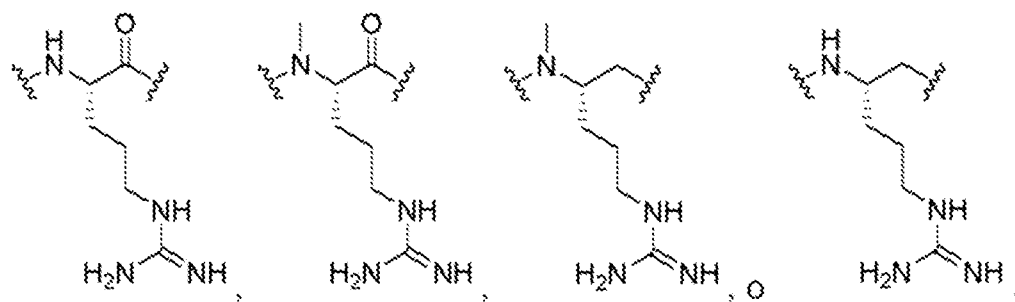
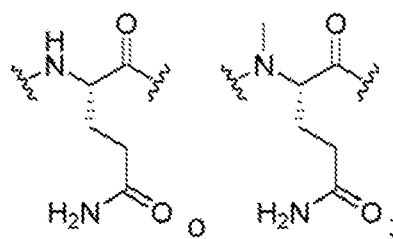
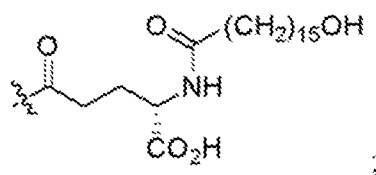
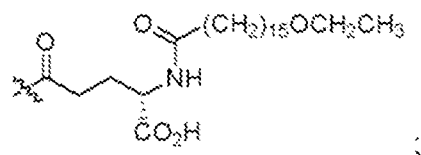
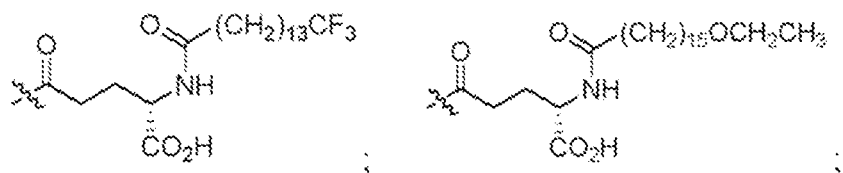
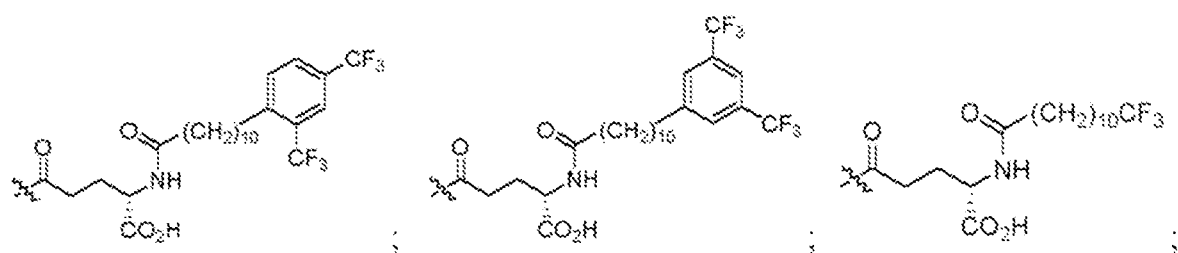
Z₃₀ es L, W, ausente o K, siempre que Z₃₀ esté ausente solo cuando q sea 1, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con





15





[0089] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico está representado por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3 o 5;

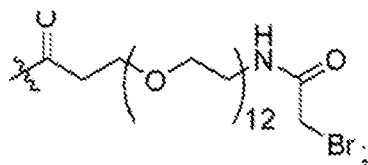
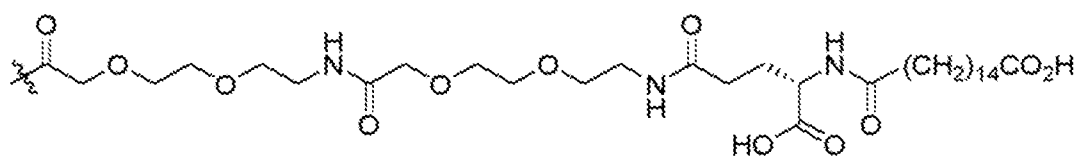
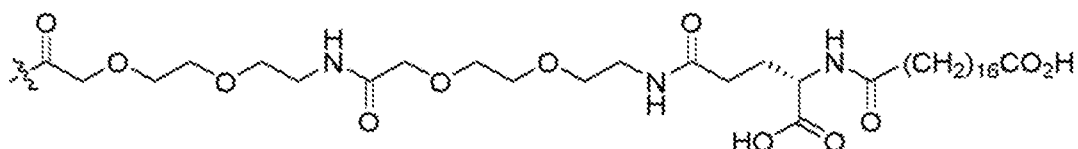
n es 1, 2 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ está ausente;

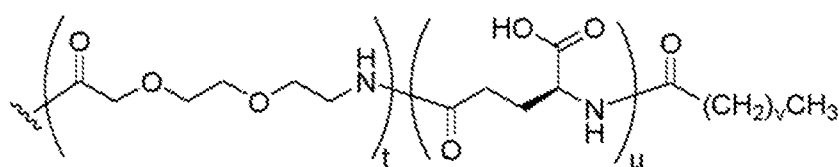
PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S o R;

Z₇ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



Z₉ es G o K, en donde la cadena lateral ami está sustituida con

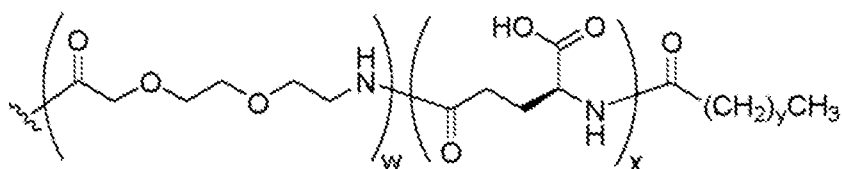


en donde t es 0;

u es 1; y

v es 14;

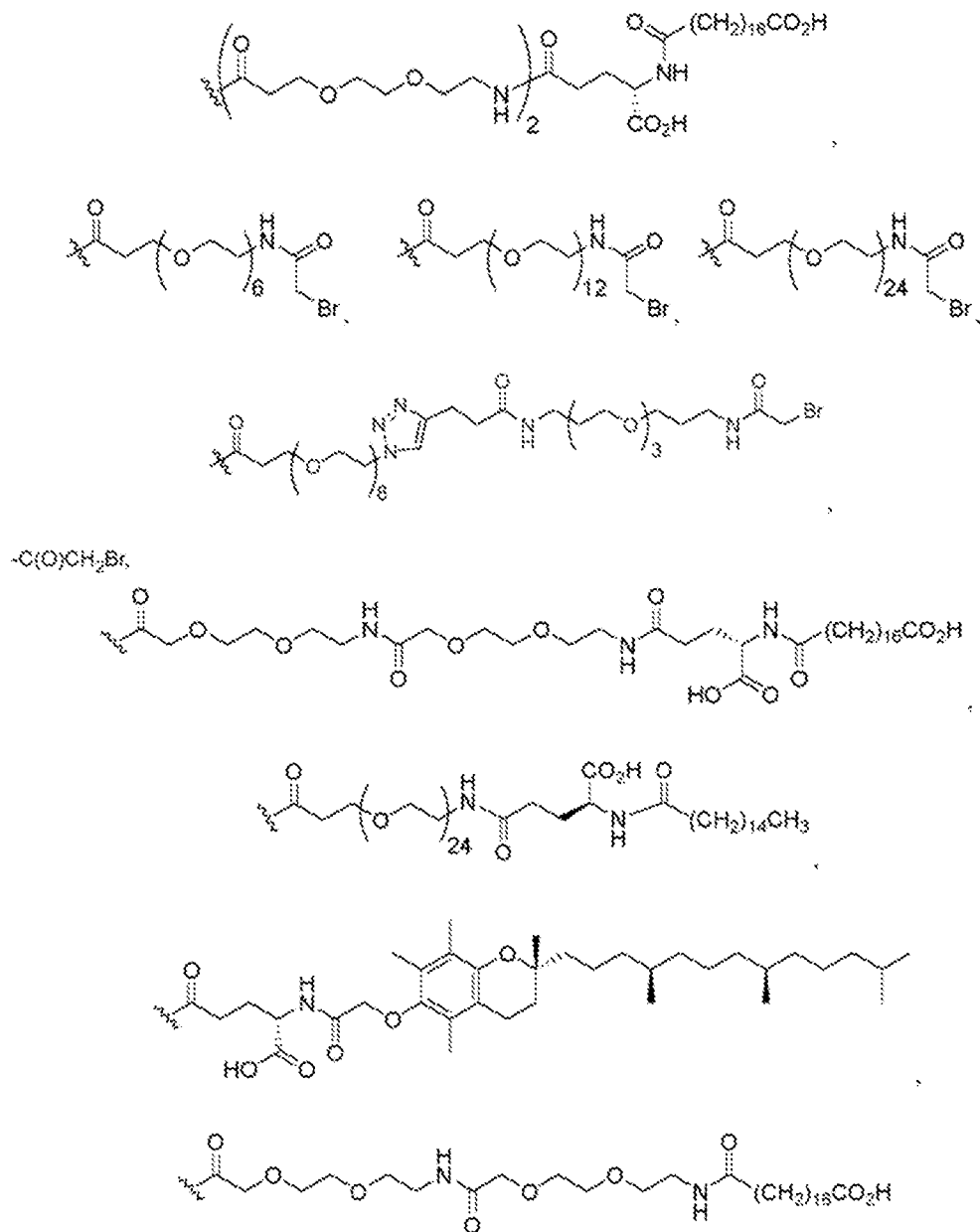
Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



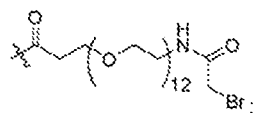
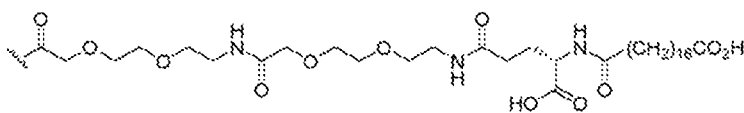
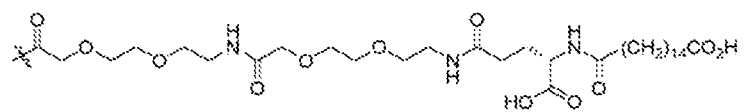
en donde w es 0, o 4;

x es 1; e

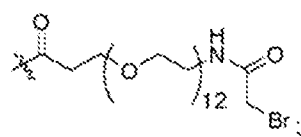
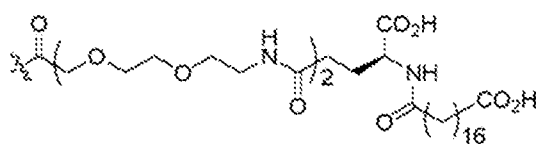
y es 14;



o Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con

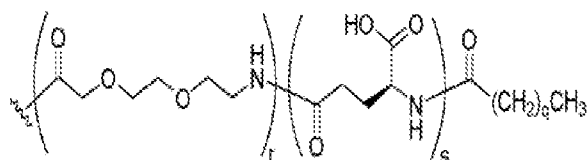
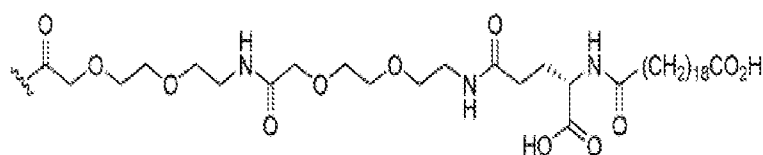
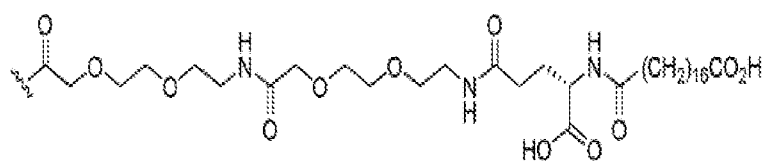
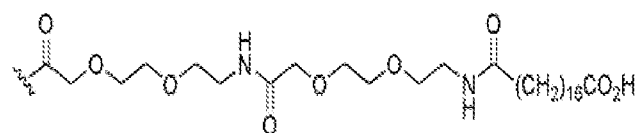
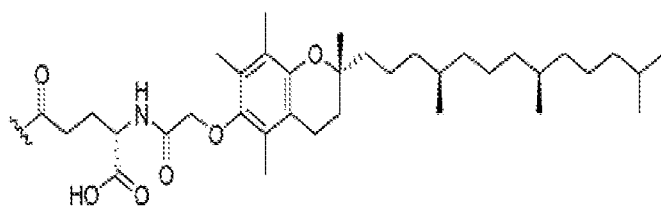


Z_{23} es S o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con

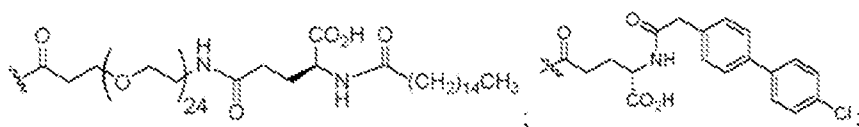


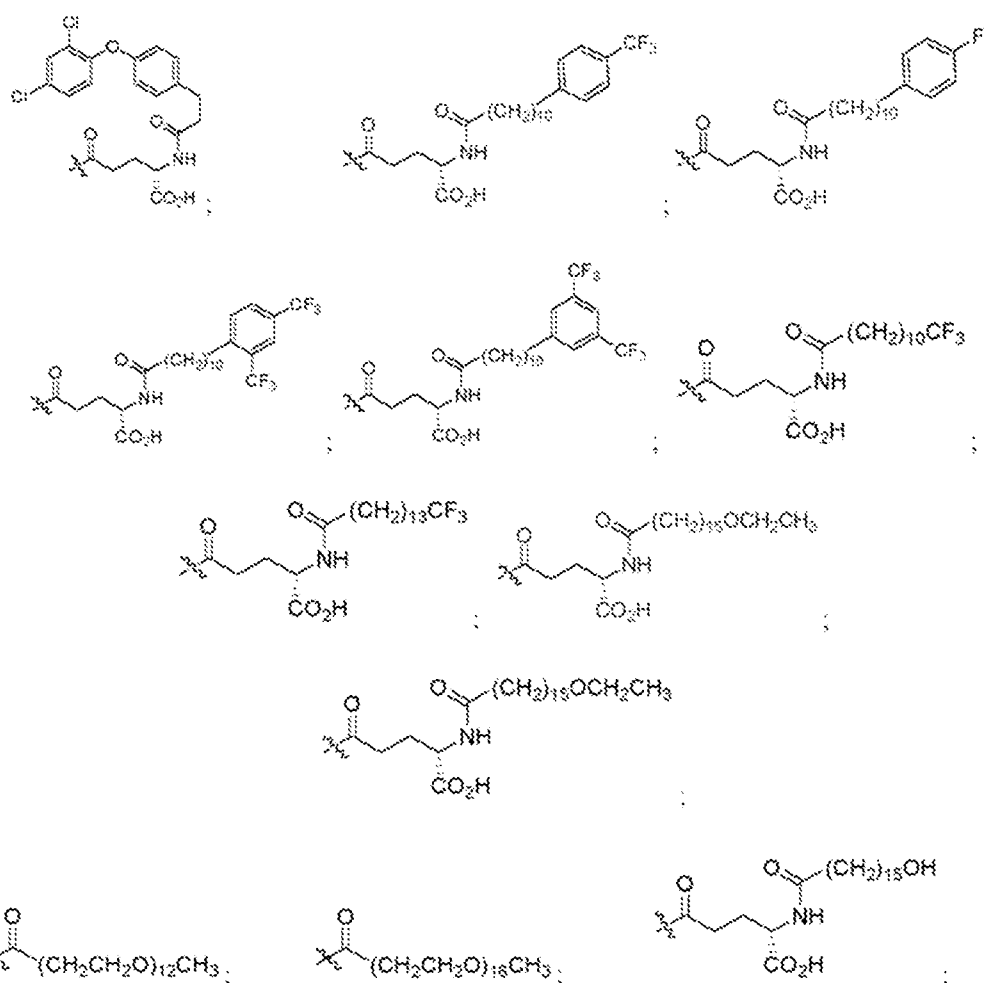
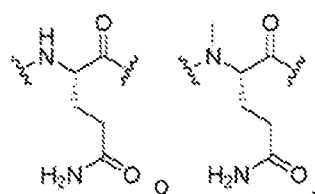
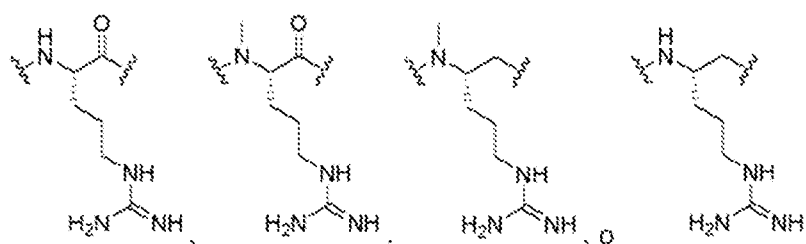
Z_{26} es A o H;

Z_{30} es L o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está sustituida con



en donde r es 0, o 2;
s es 1; y
q es 14, 16, o 18; o



Z₃₄ esZ₃₅ es

[0090] En ciertas formas de realización, el péptido PYY cíclico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-100 y SEQ ID NO: 147-156. En una forma de realización preferida, el péptido PYY cíclico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73-100 y SEQ ID NO: 147-156.

[0091] En ciertas formas de realización, un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una forma de realización de la invención está unido covalentemente al péptido PYY cíclico en un residuo de lisina del

péptido PYY cíclico a través de un enlazador. El enlazador puede, por ejemplo, comprender un enlazador seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG) 8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG₄, una cadena de PEG de 2-24 unidades de PEG, una cadena de alquilo que contiene 2-10 átomos de carbono, (Gly₄Ser)_j donde j = 1-4, (AlaPro)_u donde u = 1-10, o un enlace.

[0092] Un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una forma de realización de la invención se puede conjugar con un péptido PYY cíclico en una o más posiciones de aminoácidos del PYY cíclico, como el residuo de aminoácido 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 30 o 31 del PYY utilizando métodos conocidos en la técnica. La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la de hPYY₃₋₃₆. En ciertas formas de realización, solo uno de Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ y Z₂₃ en la Fórmula I es lisina, y la lisina está unida covalentemente a un residuo de cisteína diseñado del anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno a través del enlazador. En una forma de realización preferida, un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una forma de realización de la invención se conjuga con un péptido PYY cíclico en el residuo 11 del PYY cíclico. En otra forma de realización preferida, se introduce un electrófilo, como bromoacetamida o maleimida, en una cadena lateral de un PYY cíclico, como la cadena lateral amino de una lisina en el residuo 11 del PYY cíclico, y el electrófilo reacciona en un sitio específico con el grupo sulfhidrido del residuo Cys diseñado en un CDR, preferiblemente HCDR3, del anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, creando así un enlace covalente entre el péptido PYY cíclico y el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. Más preferiblemente, el péptido PYY cíclico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NOs: 73-100 y SEQ ID NOs: 147-156. En una forma de realización, el electrófilo se introduce directamente en la cadena lateral de un PYY cíclico. En otra forma de realización, el electrófilo se introduce indirectamente en la cadena lateral de un PYY cíclico a través de un enlazador.

[0093] También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención y que comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Péptidos PYY cíclicos

[0094] PYY₃₋₃₆ es una hormona endógena secretada por las células L en el intestino distal que actúa como un agonista del receptor Y2 para inhibir la ingesta de alimentos. Dado su papel en el control del apetito y la ingesta de alimentos, así como sus efectos antisecretores y proabsortivos en el tracto gastrointestinal en mamíferos, PYY₃₋₃₆ puede ser eficaz en el tratamiento de la obesidad y afecciones asociadas, así como en una serie de trastornos gastrointestinales. Sin embargo, la utilidad terapéutica de PYY₃₋₃₆ en sí como agente de tratamiento está limitada por su rápido metabolismo y su corta vida media circulante. Por lo tanto, la presente invención se refiere en general a conjugados de PYY₃₋₃₆ modificados, que extienden la vida media del péptido PYY₃₋₃₆ y reducen el metabolismo del péptido *in vivo*.

[0095] En ciertas formas de realización de la invención, los péptidos PYY₃₋₃₆ modificados son péptidos PYY cíclicos. Los términos "péptido PYY cíclico", "análogo PYY₃₋₃₆ cíclico" y "análogo péptido PYY₃₋₃₆ cíclico" se pueden utilizar indistintamente. Ejemplos de péptidos PYY cíclicos que se pueden utilizar en los conjugados se describen en la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 62/413.613, presentada el 27 de octubre de 2016, y la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º _ titulada "Compuestos de tirosina de péptido cíclico como moduladores de receptores de neuropéptidos", presentada el mismo día que esta solicitud con el Número de expediente del abogado PRD3411.

[0096] Como se utiliza en este documento, el término "NTSC-PYY" pretende describir análogos cíclicos de PYY desde el extremo N hasta la cadena lateral.

[0097] Las secuencias de péptidos descritas en este documento se escriben de acuerdo con la convención habitual por la cual la región N-terminal del péptido está a la izquierda y la región C-terminal está a la derecha. Aunque se conocen formas isoméricas de los aminoácidos, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente lo contrario. Para facilitar la descripción de las moléculas de esta invención, se utilizan abreviaturas convencionales y no convencionales para varios aminoácidos (códigos de una y tres letras) y fracciones funcionales. Estas abreviaturas son familiares para los expertos en la materia, pero para mayor claridad se enumeran de la siguiente manera: A = Ala = alanina; R = Arg = arginina; N = Asn = asparagina; D = Asp = ácido aspártico; βA = βAla = beta-alanina; C = Cys = cisteína; hC = hCys = homocisteína; E = Glu = ácido glutámico; Q = Gln = glutamina; G = Gly = glicina; H = His = histidina; I = Ile = isoleucina; L = Leu = leucina; K = Lys = lisina; Nle = norleucina; F = Phe = fenilalanina; P = Pro = prolina; S = Ser = serina; T = Thr = treonina; W = Trp = triptófano; Y = Tyr = tirosina y V = Val = valina.

[0098] Por conveniencia, la convención de numeración de residuos de aminoácidos utilizada para nombrar los péptidos NTSC-PYY de la presente invención sigue la de hPYY₃₋₃₆. Los reemplazos de aminoácidos específicos que se han introducido en los péptidos NTSC-PYY, en relación con los residuos nativos en las posiciones correspondientes en hPYY₃₋₃₆, se indican mediante el código de aminoácido apropiado, seguido de la posición de la sustitución. Por lo tanto, "S4" en el péptido NTSC-PYY se refiere a un péptido en el que la serina ha reemplazado el residuo lys4 nativo correspondiente de hPYY₃₋₃₆. De manera similar, "hC31" en el péptido NTSC-PYY se refiere a un péptido en el que la homocisteína ha reemplazado el residuo val31 nativo correspondiente de hPYY₃₋₃₆. Los reemplazos de aminoácidos adicionales que ocurren dentro de los péptidos NTSC-PYY se describen de acuerdo con esta convención y serán reconocidos como tales por un experto en la materia.

[0099] También por conveniencia, la convención de denominación utilizada para los péptidos NTSC-PYY de la presente invención incorpora los residuos amino involucrados en el ciclo junto con el grupo o grupos de enlace entre ellos en una dirección de izquierda a derecha, comenzando desde el residuo N-terminal involucrado en el ciclo. En todos los casos, el residuo de aminoácido N-terminal del ciclo se enlaza por medio de su funcionalidad α -amino al grupo de enlace, que a su vez se conecta al residuo de cadena lateral del aminoácido en la posición 31 del péptido NTSC-PYY. Por lo tanto, se utiliza "ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31)" para describir el ciclo de un péptido NTSC-PYY en el que la funcionalidad α -amino de Ile3 está acilada con un residuo de ácido meta-tolúico, cuyo grupo metilo está además enlazado por medio de un enlace tioéter a la cadena lateral de un residuo hCys31. De manera similar, se utiliza "ciclo-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31)" para describir el ciclo de un péptido NTSC-PYY, en el que se ha eliminado el residuo nativo Ile3 y cuya funcionalidad α -amino (ahora N-terminal) de lys4 está acilada por un grupo 3-acetamidopropanoilo, cuyo carbono metileno acetamido está conectado a la cadena lateral de un residuo hCys31 mediante un enlace tioéter.

[0100] Los residuos de lisina se pueden incorporar en varias posiciones de la secuencia hPYY₃₋₃₆ para proporcionar un mecanismo funcional conveniente para una derivatización adicional. Los residuos de lisina se pueden modificar para acoplarse al anticuerpo monoclonal ya sea directa o indirectamente. En un acoplamiento indirecto al anticuerpo monoclonal, el residuo de lisina se puede modificar para que comprenda un enlazador que permitirá que el péptido PYY cíclico se acople al anticuerpo monoclonal. Un experto en la materia reconocerá que los ortólogos relacionados también se podrían emplear eficazmente como tales y se contemplan en el presente documento.

[0101] El término, "K(y-Glu)", que aparece en la secuencia peptídica, representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por el grupo γ -carboxilo del ácido glutámico.

[0102] El término, "K(y-Glu-Pal (palmitoil))" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por el grupo γ -carboxilo del ácido N-hexadecan-1-olglutámico.

[0103] El término, "K(y-Glu-Stear (estearoil))" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por el grupo γ -carboxilo del ácido N-octadecan-1-olglutámico.

[0104] El término, "K(y-Glu-Arach (araquidol))" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por el grupo γ -carboxilo del ácido N-dodecan-1-olglutámico.

[0105] El término, "K(OEG) (8-amino-3,6-dioxaoctanoilo)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por el ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico.

[0106] El término, "(OEG)₂" representa dos unidades OEG unidas entre sí en sucesión a través de un enlace amida (es decir, ácido 17-amino-10-oxo-3,6,12,15-tetraoxa-9-azaheptadecanoico).

[0107] El término, "K(OEG)₂" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por ácido 17-amino-10-oxo-3,6,12,15-tetraoxa-9-azaheptadecanoico.

[0108] El término, "K((OEG)₂- γ -Glu)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido (22 S)-22-amino-10,19-dioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazatricosanedioico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0109] El término, "K((OEG)₂- γ -Glu-Stear)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido (22 S)-10,19-dioxo-22-estearamido-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazatricosanedioico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0110] El término, "K((OEG)₂- γ -Glu-COC₁₆CO₂H)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido (21S)-9,18,23-trioxo-2,5,11,14-tetraoxa-8,17,22-triazanonatriacantano-1,21,39-tricarboxílico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0111] De manera similar, el término "K((OEG)₂- γ -Glu-COC₁₈CO₂H)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por (21S)-9,18,23-trioxo-2,5,11,14-tetraoxa-8,17,22-triazahentetracontano-1,21,41-tricarboxílico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0112] El término, "K((OEG)₂-COC₁₆CO₂H)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por ácido 10,19-dioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazahexatriacontanodioico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0113] El término "K(PEG24-AcBr)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido N-bromoacetil-75-amino-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-tetracosaoxapentaheptacontanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0114] El término "K(PEG12-AcBr)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido N-bromoacetil-39-amino-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-dodecaoxanonatriacontanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

5 **[0115]** El término "K(PEG6-AcBr)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de la cadena lateral ha sido acilado por N-bromoacetil-3-**[(17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-il)oxi]**-propanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

10 **[0116]** El término "K(PEG8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por ácido 27-[4-[2-[3-[2-[2-[3-(N-bromoacetilamino)propoxi]etoxi]etoxi]propilaminocarbonil]etil]tetrazol-1-il]-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxaheptacosanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

15 **[0117]** El término "K(mPEG16)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49-hexadecaioxapentacontanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

20 **[0118]** El término "K(mPEG12)" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por el ácido 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-dodecaoxaoctatriacontanoico a través de su funcionalidad de ácido 1-carboxílico.

[0119] El término "VitE" representa una unidad de α -tocoferolilo en la molécula.

25 **[0120]** El término, "AcVitE" representa una unidad de α -tocoferolilo cuyo grupo fenólico lleva una funcionalidad metilencilcarboxi unida a éter.

30 **[0121]** El término, K- γ -Glu-AcVitE" representa un residuo de lisinilo cuyo grupo ϵ -amino de cadena lateral ha sido acilado por ácido (2-(((2R)-2,5,7,8-tetrametil-2-((4R,8R)-4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-il)oxi)acetil)-L-glutámico a través de su funcionalidad de ácido γ -carboxílico.

[0122] Muchos de los compuestos/conjugados de la presente invención incorporan un enlace amida reducido entre el residuo C-terminal de la secuencia, Y36, y su residuo adyacente, R35. Este enlace amida reducido está representado por el término "psi-(R35,Y36)".

35 **[0123]** Diversos residuos de aminoácidos que comprenden ciertas secuencias de la presente invención contienen grupos α -amino que han sido metilados. Por lo tanto, los términos, "N-Me-Q34" o "N-Me-R35" representan glutamina α -N-metilada en la posición 34 de una secuencia, y arginina α -N-metilada en la posición 35 de una secuencia, respectivamente.

40 **[0124]** El término, "N-Me-Q34, psi-(R35,Y36)" en una descripción de secuencia se refiere a una secuencia que contiene tanto un residuo de α -metilglutamina en la posición 34, como un enlace amida reducido entre los residuos R35 e Y36.

[0125] De manera similar, el término "N-Me-R35, psi-(R35,Y36)" en una descripción de secuencia se refiere a una secuencia que contiene tanto un residuo de α -metilarginina en la posición 35, como un enlace amida reducido entre este residuo e Y36.

Fracciones que extienden la vida media

50 **[0126]** Además del anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, los conjugados de la invención pueden incorporar uno o más grupos adicionales para prolongar la vida media del grupo activo farmacéutico (por ejemplo, el péptido PYY cíclico), por ejemplo, mediante interacción covalente. Otros grupos adicionales de prolongación de la vida media ejemplares incluyen, entre otros, albúmina, variantes de albúmina, proteínas y/o dominios de unión a albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de los mismos. Las fracciones adicionales que prolongan la vida media que se pueden incorporar en los conjugados de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de polietilenglicol (PEG), como PEG5000 o PEG20.000, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena, por ejemplo, laurato, miristato, estearato, araquidato, behenato, oleato, araquidonato, ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico y similares, polilisina, octano, carbohidratos (dextrano, celulosa, oligo o polisacáridos) para las propiedades deseadas. Estas fracciones pueden ser fusiones directas con las secuencias codificantes del armazón de proteínas y se pueden generar mediante técnicas de clonación y expresión estándar. Alternativamente, se pueden utilizar métodos de acoplamiento químico bien conocidos para unir las fracciones a conjugados de la invención producidos de forma recombinante y química.

[0127] Se puede añadir, por ejemplo, una fracción pegilo a las moléculas de péptidos de la invención incorporando un residuo de cisteína al extremo C de la molécula y uniendo un grupo pegilo a la cisteína utilizando métodos bien conocidos.

65 **[0128]** Las moléculas de péptidos de la invención que incorporan fracciones adicionales se pueden comparar en cuanto a funcionalidad mediante varios ensayos bien conocidos. Por ejemplo, las actividades biológicas o farmacocinéticas de

un péptido terapéutico de interés, solo o en un conjugado de acuerdo con la invención, se pueden analizar utilizando ensayos in vitro o in vivo conocidos y comparar.

Composiciones farmacéuticas

[0129] En otro aspecto general, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los conjugados y compuestos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "composición farmacéutica" tal como se utiliza en el presente documento significa un producto que comprende un conjugado de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los conjugados y compuestos de la invención y las composiciones que los comprenden también son útiles en la fabricación de un medicamento para las aplicaciones terapéuticas mencionadas en el presente documento.

[0130] Como se utiliza en el presente documento, el término "vehículo" se refiere a cualquier excipiente, diluyente, relleno, sal, tampón, estabilizador, solubilizante, aceite, lípido, vesícula que contiene lípidos, microesfera, encapsulación liposomal u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente o diluyente dependerán de la vía de administración para una aplicación particular. Como se utiliza en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de una composición según la invención o la actividad biológica de una composición según la invención. Según formas de realización particulares, en vista de la presente divulgación, cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para su uso en una composición farmacéutica de anticuerpos se puede utilizar en la invención.

[0131] Las sales ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclaro, tosiloato y trietioduro. Los ácidos orgánicos o inorgánicos también incluyen, sin limitación, ácido yodhídrico, perclórico, sulfúrico, fosfórico, propiónico, glicólico, metanosulfónico, hidroxietanosulfónico, oxálico, 2-naftalenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclohexanosulfámico, sacarínico o trifluoroacético.

[0132] Las sales catiónicas/básicas farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aluminio, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (también conocido como tris(hidroximetil)aminometano, trometano o "TRIS"), amoníaco, benzetina, t-butilamina, calcio, cloroprocaina, colina, ciclohexilamina, dietanolamina, etilendiamina, litio, lisina, magnesio, meglumina, N-metil-D-glucamina, piperidina, potasio, procaina, quinina, sodio, trietanolamina o zinc.

[0133] En algunas formas de realización de la invención, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la invención en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, o de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL. La formulación farmacéutica puede tener un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 10, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 9. La formulación puede comprender además al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizador(es) y surfactante(s).

[0134] La formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con vehículos farmacéuticamente aceptables es conocida en la técnica, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo, 21.ª edición (2005) y cualquier edición posterior). Los ejemplos no limitantes de ingredientes adicionales incluyen: tampones, diluyentes, disolventes, agentes reguladores de la tonicidad, conservantes, estabilizadores y agentes quelantes. Se pueden utilizar uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación de las composiciones farmacéuticas de la invención.

[0135] En una forma de realización de la invención, la composición farmacéutica es una formulación líquida. Un ejemplo preferido de una formulación líquida es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. La formulación líquida puede comprender una solución, una suspensión, una emulsión, una microemulsión, un gel y similares. Una formulación acuosa comprende típicamente al menos 50 % p/p de agua, o al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o al menos 95 % p/p de agua.

[0136] En una forma de realización, la composición farmacéutica puede formularse como un inyectable que puede inyectarse, por ejemplo, a través de un dispositivo de inyección (por ejemplo, una jeringa o una bomba de infusión). La inyección puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo.

[0137] En otra forma de realización, la composición farmacéutica es una formulación sólida, por ejemplo, una composición liofilizada o secada por pulverización, que se puede utilizar tal cual, o a la que el médico o el paciente añaden disolventes y/o diluyentes antes de su uso. Las formas de dosificación sólidas pueden incluir comprimidos, como comprimidos comprimidos y/o comprimidos recubiertos, y cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina dura o blanda). La composición

farmacéutica también puede estar en forma de sobres, grageas, polvos, gránulos, pastillas o polvos para reconstitución, por ejemplo.

[0138] Las formas de dosificación pueden ser de liberación inmediata, en cuyo caso pueden comprender un vehículo soluble o dispersable en agua, o pueden ser de liberación retardada, liberación sostenida o liberación modificada, en cuyo caso pueden comprender polímeros insolubles en agua que regulan la velocidad de disolución de la forma de dosificación en el tracto gastrointestinal.

[0139] En otras formas de realización, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intranasal, intrabucal o sublingual.

[0140] El pH en una formulación acuosa puede estar entre pH 3 y pH 10. En una forma de realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,5. En otra forma de realización de la invención, el pH de la formulación es de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0.

[0141] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un tampón. Ejemplos no limitantes de tampones incluyen: arginina, ácido aspártico, bicina, citrato, fosfato de hidrógeno disódico, ácido fumárico, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, ácido maleico, ácido málico, acetato de sodio, carbonato de sodio, fosfato de dihidrógeno de sodio, fosfato de sodio, succinato, ácido tartárico, tricina y tris(hidroximetil)-aminometano, y mezclas de los mismos. El tampón puede estar presente individualmente o en el agregado, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos tampones específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0142] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un conservante. Ejemplos no limitativos de tampones incluyen: cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, bronopol, 4-hidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, clorocresol, clorohexidina, clorfenesina, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 4-hidroxibenzoato de etilo, imidurea, 4-hidroxibenzoato de metilo, fenol, 2-fenoxietanol, 2-feniletanol, 4-hidroxibenzoato de propilo, deshidroacetato de sodio, tiomerosal y mezclas de los mismos. El conservante puede estar presente individualmente o en el agregado, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos conservantes específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0143] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente isotónico. Ejemplos no limitantes de la forma de realización incluyen una sal (tal como cloruro de sodio), un aminoácido (tal como glicina, histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano y treonina), un alditol (tal como glicerol, 1,2-propanodiol, propilenglicol), 1,3-propanodiol y 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) y mezclas de los mismos. Otro ejemplo de un agente isotónico incluye un azúcar. Ejemplos no limitativos de azúcares pueden ser mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta-HPCD, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa sódica. Otro ejemplo de un agente isotónico es un alcohol de azúcar, en donde el término "alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C(4-8) que tiene al menos un grupo -OH. Ejemplos no limitativos de alcoholes de azúcar incluyen manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada agente isotónico enumerado en este párrafo constituyen formas de realización alternativas de la invención. El agente isotónico puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0144] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un agente quelante. Ejemplos no limitativos de agentes quelantes incluyen ácido cítrico, ácido aspártico, sales de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y mezclas de los mismos. El agente quelante puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos agentes quelantes específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0145] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizador. Ejemplos no limitativos de estabilizadores incluyen uno o más inhibidores de agregación, uno o más inhibidores de oxidación, uno o más surfactantes y/o uno o más inhibidores de proteasa.

[0146] En otra forma de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un estabilizador, en donde dicho estabilizador es carboxi-/hidroxicelulosa y derivados de la misma (tales como HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, 2-metiltoetanol, polietilenglicol (tal como PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, sales (tales como cloruro de sodio), sustancias que contienen azufre tales como monotioglicerol) o ácido tioglicólico. El estabilizador puede estar presente individualmente o en el agregado, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las

composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos estabilizadores específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0147] En otras formas de realización de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más surfactantes, preferiblemente un surfactante, al menos un surfactante, o dos surfactantes diferentes. El término "surfactante" se refiere a cualquier molécula o ion que esté compuesto por una parte soluble en agua (hidrófila) y una parte soluble en grasa (lipófila). El surfactante puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en surfactantes aniónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes no iónicos y/o surfactantes zwitteriónicos. El surfactante puede estar presente individualmente o en el agregado, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos surfactantes específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0148] En una forma de realización adicional de la invención, la composición farmacéutica comprende uno o más inhibidores de proteasa, tales como, por ejemplo, EDTA y/o ácido clorhídrico benzamida (HCl). El inhibidor de proteasa puede estar presente individualmente o en conjunto, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada uno de estos inhibidores de proteasa específicos constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0149] La composición farmacéutica de la invención puede comprender una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados del polipéptido durante el almacenamiento de la composición. El término "base de aminoácidos" se refiere a uno o más aminoácidos (tales como metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), o análogos de los mismos. Cualquier aminoácido puede estar presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de los mismos) de la base de aminoácidos puede estar presente. La base de aminoácidos puede estar presente individualmente o en combinación con otras bases de aminoácidos, en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cada una de estas bases de aminoácidos específicas constituyen formas de realización alternativas de la invención.

[0150] También es evidente para un experto en la materia que la dosis terapéuticamente eficaz para los conjugados de la presente invención o una composición farmacéutica de los mismos variará según el efecto deseado. Por lo tanto, un experto en la materia puede determinar fácilmente las dosis óptimas que se van a administrar y variarán con el conjugado particular utilizado, el modo de administración, la concentración de la preparación y el avance de la enfermedad. Además, los factores asociados con el sujeto particular que se está tratando, incluyendo la edad, el peso, la dieta y el momento de la administración del sujeto, darán como resultado la necesidad de ajustar la dosis a un nivel terapéutico apropiado.

[0151] Para todas las indicaciones, los conjugados de la invención se administran preferiblemente por vía periférica en una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg por día en dosis únicas o divididas (por ejemplo, una dosis única se puede dividir en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 subdosis), o en una dosis de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg por dosis, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 µg/kg a aproximadamente 250 µg/kg, lo más preferiblemente por debajo de aproximadamente 50 µg/kg. Las dosis en estos rangos variarán con la potencia de cada agonista, por supuesto, y son fácilmente determinadas por un experto en la materia. Las dosis anteriores son, por lo tanto, un ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se ameriten rangos de dosis más altos o más bajos, y los mismos están dentro del alcance de esta invención.

[0152] En ciertas formas de realización, los conjugados de la invención se administran en una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg, o en una dosis de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg, más preferiblemente en una dosis de aproximadamente 0,05 µg/kg a aproximadamente 250 µg/kg, lo más preferiblemente en una dosis por debajo de aproximadamente 50 µg/kg con una dosis de un segundo agente terapéutico (por ejemplo, liraglutida) en una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg, o en una dosis de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg, más preferiblemente en una dosis de aproximadamente 0,05 µg/kg a aproximadamente 250 µg/kg, lo más preferiblemente en una dosis por debajo de aproximadamente 50 µg/kg.

[0153] Las sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados de la invención incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de dichas sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, benzoato, bencenosulfonato, citrato, alcanforato, dodecilsulfato, clorhidrato, bromhidrato, lactato, maleato, metanosulfonato, nitrato, oxalato, pivalato, propionato, succinato, sulfato y tartrato. Las sales de base incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamino y sales con aminoácidos tales como arginina. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con, por ejemplo, haluros de alquilo.

[0154] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier vía que cumpla su propósito. Por ejemplo, la administración por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal u ocular. La administración puede ser por vía oral. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los conjugados activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua,

soluciones ácidas, soluciones alcalinas, soluciones de dextrosa-agua, soluciones de carbohidratos isotónicos y complejos de inclusión de ciclodextrina.

[0155] La presente invención también comprende un método para elaborar una composición farmacéutica que comprende mezclar un vehículo farmacéuticamente aceptable con cualquiera de los conjugados de la presente invención. Además, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas elaboradas mezclando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables con cualquiera de los conjugados de la presente invención.

[0156] Además, los conjugados de la presente invención pueden tener una o más formas cristalinas polimorfas o amorfas y, como tales, se pretende que estén incluidos en el alcance de la invención. Además, los conjugados pueden formar solvatos, por ejemplo, con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes. Como se utiliza en el presente documento, el término "solvato" significa una asociación física de los conjugados de la presente invención con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física implica diversos grados de enlace iónico y covalente, incluyendo enlaces de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislarse, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" pretende abarcar tanto los solvatos en fase de solución como los aislables. Los ejemplos no limitantes de solvatos adecuados incluyen etanolatos, metanolatos y similares.

[0157] Se pretende que la presente invención incluya dentro de su alcance polimorfos y solvatos de los conjugados de la presente invención. Por lo tanto, en los métodos de tratamiento de la presente invención, el término "administrar" abarcará los medios para tratar, mejorar o prevenir un síndrome, trastorno o enfermedad descritos en este documento con los conjugados de la presente invención o un polimorfo o solvato de los mismos, que obviamente estarían incluidos dentro del alcance de la invención, aunque no se divulgaran específicamente.

[0158] En otra forma de realización, la invención se refiere a los conjugados de la invención para su uso como medicamento.

[0159] Además, se pretende que, dentro del alcance de la presente invención, cualquier elemento, en particular cuando se menciona en relación con los conjugados de la invención, comprenderá todos los isótopos y mezclas isotópicas de dicho elemento, ya sea de origen natural o producidos sintéticamente, ya sea con abundancia natural o en una forma isotópicamente enriquecida. Por ejemplo, una referencia a hidrógeno incluye dentro de su alcance ^1H , ^2H (D) y ^3H (T). De manera similar, las referencias a carbono y oxígeno incluyen dentro de su alcance respectivamente ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C y ^{16}O y ^{18}O . Los isótopos pueden ser radiactivos o no radiactivos. Los conjugados radiomarcados de la invención pueden comprender un isótopo radiactivo seleccionado del grupo de ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{122}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br y ^{82}Br . Preferiblemente, el isótopo radiactivo se selecciona del grupo de ^3H , ^{11}C y ^{18}F .

[0160] Algunos conjugados de la presente invención pueden existir como atropisómeros. Los atropisómeros son estereoisómeros resultantes de una rotación impedida alrededor de enlaces simples donde la barrera de tensión estérica a la rotación es lo suficientemente alta como para permitir el aislamiento de los conformeros. Debe entenderse que todos estos conformeros y mezclas de los mismos están comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

[0161] Cuando los procesos para la preparación de los conjugados según la invención dan lugar a una mezcla de estereoisómeros, estos isómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía preparativa. Los conjugados pueden prepararse en forma racémica, o pueden prepararse enantiómeros individuales mediante síntesis enantioespecífica o mediante resolución. Los conjugados pueden, por ejemplo, resolverse en sus enantiómeros componentes mediante técnicas estándar, tales como la formación de pares diastereoméricos mediante la formación de sal con un ácido ópticamente activo, tal como ácido (-)-diptoluoil-D-tartárico y/o ácido (+)-di-p-toluoil-L-tartárico seguido de cristalización fraccionada y regeneración de la base libre. Los conjugados también pueden resolverse mediante la formación de ésteres o amidas diastereoméricos, seguido de separación cromatográfica y eliminación del auxiliar quiral. Como alternativa, los conjugados se pueden resolver utilizando una columna quiral mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o SFC. En algunos casos, pueden existir rotámeros de conjugados que se observan mediante RMN ^1H , lo que genera multipletes complejos e integración de picos en el espectro de RMN ^1H .

[0162] Durante cualquiera de los procesos de preparación de los conjugados de la presente invención, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas en cuestión. Esto puede lograrse por medio de grupos protectores convencionales, tales como los descritos en Protective Groups in Organic Chemistry, ed. JFW McOmie, Plenum Press, 1973; y TW Greene & PGM Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991. Los grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior conveniente utilizando métodos conocidos en la técnica.

Métodos de uso

[0163] La presente invención está dirigida a los conjugados de la invención para su uso en un método para prevenir, tratar o mejorar un síndrome, trastorno o enfermedad mediado por el receptor Y2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención.

[0164] La presente invención también proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición de, o mejorar un trastorno, enfermedad o condición o cualquiera de uno o más síntomas de dicho trastorno, enfermedad o condición en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención.

[0165] Según formas de realización particulares, el trastorno o condición patológica se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o II, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles no controlados de colesterol y/o lípidos, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y/o eczema.

[0166] Según formas de realización particulares, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de terapia que es suficiente para lograr uno, dos, tres, cuatro o más de los siguientes efectos: (i) reducir o mejorar la gravedad de la enfermedad, trastorno o condición a tratar o un síntoma asociado con el mismo; (ii) reducir la duración de la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (iii) prevenir la progresión de la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (iv) causar regresión de la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (v) prevenir el desarrollo o aparición de la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (vi) prevenir la recurrencia de la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (vii) reducir la hospitalización de un sujeto que tiene la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con el mismo; (viii) reducir la duración de la hospitalización de un sujeto que padece la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con esta; (ix) aumentar la supervivencia de un sujeto que padece la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con esta; (xi) inhibir o reducir la enfermedad, trastorno o condición a tratar, o un síntoma asociado con esta en un sujeto; y/o (xii) aumentar o mejorar el efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia.

[0167] La cantidad o dosis terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con diversos factores, tales como la enfermedad, trastorno o condición a tratar, los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del sujeto (incluyendo, por ejemplo, edad, peso corporal, salud), si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis del tratamiento se titulan de manera óptima para optimizar la seguridad y eficacia.

[0168] Como se utiliza en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" pretenden hacer referencia a una mejora o reversión de al menos un parámetro físico medible relacionado con la enfermedad, trastorno o afección, que no es necesariamente discernible en el sujeto, pero puede ser discernible en el sujeto. Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" también pueden hacer referencia a provocar una regresión, prevenir la progresión o al menos ralentizar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección. En una forma de realización particular, "tratar", "tratando" y "tratamiento" hacen referencia a un alivio, prevención del desarrollo o aparición, o reducción en la duración de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección. En una forma de realización particular, "tratar", "tratando" y "tratamiento" hacen referencia a la prevención de la recurrencia de la enfermedad, trastorno o afección. En una forma de realización particular, "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un aumento en la supervivencia de un sujeto que padece la enfermedad, trastorno o afección. En una forma de realización particular, "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a la eliminación de la enfermedad, trastorno o afección en el sujeto.

[0169] En una forma de realización, la invención proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición de, o mejorar la obesidad, o cualquiera de uno o más síntomas de obesidad en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención. En algunas formas de realización, el peso corporal de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 %, entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 0,5 %, entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 1 %, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %, entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 3 %, entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 10 %, entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 15 %, entre aproximadamente 15 % y aproximadamente 20 %, entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 %, entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 30 %, entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 35 %, entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 40 %, entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 45 %, o entre aproximadamente 45 % y aproximadamente 50 %, en relación con el peso corporal de un sujeto antes de la administración de cualquiera de los conjugados, compuestos, composiciones farmacéuticas, formas o medicamentos de la invención descritos en este documento, o en comparación con el control. sujetos que no reciben ninguno de los conjugados, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento.

[0170] En algunas formas de realización, la reducción del peso corporal se mantiene durante aproximadamente 1 semana, durante aproximadamente 2 semanas, durante aproximadamente 3 semanas, durante aproximadamente 1 mes, durante aproximadamente 2 meses, durante aproximadamente 3 meses, durante aproximadamente 4 meses, durante aproximadamente 5 meses, durante aproximadamente 6 meses, durante aproximadamente 7 meses, durante aproximadamente 8 meses, durante aproximadamente 9 meses, durante aproximadamente 10 meses, durante

aproximadamente 11 meses, durante aproximadamente 1 año, durante aproximadamente 1,5 años, durante aproximadamente 2 años, durante aproximadamente 2,5 años, durante aproximadamente 3 años, durante aproximadamente 3,5 años, durante aproximadamente 4 años, durante aproximadamente 4,5 años, durante aproximadamente 5 años, durante aproximadamente 6 años, durante aproximadamente 7 años, durante aproximadamente 8 años, durante aproximadamente 9 años, durante aproximadamente 10 años, durante aproximadamente 15 años o durante aproximadamente 20 años, por ejemplo.

[0171] La presente invención proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición de, o mejorar un síndrome, trastorno o enfermedad, o uno o más síntomas de dicho síndrome, trastorno o enfermedad en un sujeto que lo necesite, en donde dicho síndrome, trastorno o enfermedad se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema, que comprende administrar al sujeto que lo necesite un medicamento eficaz cantidad de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención.

[0172] Como se utiliza en el presente documento, el síndrome metabólico se refiere a un sujeto que tiene uno o más de los siguientes: niveles altos de azúcar en sangre (p. ej., niveles altos de azúcar en sangre en ayunas), presión arterial alta, niveles anormales de colesterol (p. ej., niveles bajos de HDL), niveles anormales de triglicéridos (p. ej., triglicéridos altos), una cintura grande (es decir, circunferencia de la cintura), aumento de grasa en el área abdominal, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, niveles elevados de proteína C reactiva (es decir, un estado proinflamatorio) y niveles aumentados de inhibidor del activador del plasminógeno-1 y fibrinógeno en plasma (es decir, un estado protrombótico).

[0173] La presente invención proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método para reducir la ingesta de alimentos en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención. En algunas formas de realización, la ingesta de alimentos de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 %, entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 0,5 %, entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 1 %, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %, entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 3 %, entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 10 %, entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 15 %, entre aproximadamente 15 % y aproximadamente 20 %, entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 %, entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 30 %, entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 35 %, entre aproximadamente 35 % y aproximadamente 40 %, entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 45 %, o entre aproximadamente 45 % y aproximadamente 50 %, en relación con la ingesta de alimentos de un sujeto antes de la administración de cualquiera de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento, o en comparación con el control. sujetos que no reciben ninguno de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento.

[0174] En algunas formas de realización, la reducción en la ingesta de alimentos se mantiene durante aproximadamente 1 semana, durante aproximadamente 2 semanas, durante aproximadamente 3 semanas, durante aproximadamente 1 mes, durante aproximadamente 2 meses, durante aproximadamente 3 meses, durante aproximadamente 4 meses, durante aproximadamente 5 meses, durante aproximadamente 6 meses, durante aproximadamente 7 meses, durante aproximadamente 8 meses, durante aproximadamente 9 meses, durante aproximadamente 10 meses, durante aproximadamente 11 meses, durante aproximadamente 1 año, durante aproximadamente 1,5 años, durante aproximadamente 2 años, durante aproximadamente 2,5 años, durante aproximadamente 3 años, durante aproximadamente 3,5 años, durante aproximadamente 4 años, durante aproximadamente 4,5 años, durante aproximadamente 5 años, durante aproximadamente 6 años, durante aproximadamente 7 años, durante aproximadamente 8 años, durante aproximadamente 9 años, durante aproximadamente 10 años, durante aproximadamente 15 años o durante aproximadamente 20 años, por ejemplo.

[0175] La presente invención proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método para reducir la hemoglobina glucosilada (A1C) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención. En algunas formas de realización, la A1C de un sujeto se reduce, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 0,01 %, entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 0,1 %, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 0,2 %, entre aproximadamente el 0,2 % y aproximadamente el 0,3 %, entre aproximadamente el 0,3 % y aproximadamente el 0,4 %, entre aproximadamente el 0,4 % y aproximadamente el 0,5 %, entre aproximadamente el 0,5 % y aproximadamente el 1 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 1,5 %, entre aproximadamente el 1,5 % y aproximadamente el 2 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 2,5 %, entre aproximadamente el 2,5 % y aproximadamente el 3 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 4 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 6 %, entre aproximadamente el 6 % y aproximadamente el 7 %, entre aproximadamente el 7 % y aproximadamente el 8 %, entre

aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 9 %, o entre aproximadamente el 9 % y aproximadamente el 10 % en relación con la A1C de un sujeto antes de la administración de cualquiera de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento, o en comparación con sujetos de control que no recibieron ninguno de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento.

[0176] En otras formas de realización, los conjugados de la invención se proporcionan para su uso en métodos para reducir los niveles de glucosa en sangre en ayunas en un sujeto que los necesita, comprendiendo los métodos administrar al sujeto que los necesita una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas se pueden reducir a menos de aproximadamente 140 a aproximadamente 150 mg/dL, menos de aproximadamente 140 a aproximadamente 130 mg/dL, menos de aproximadamente 130 a aproximadamente 120 mg/dL, menos de aproximadamente 120 a aproximadamente 110 mg/dL, menos de aproximadamente 110 a aproximadamente 100 mg/dL, menos de aproximadamente 100 a aproximadamente 90 mg/dL, o menos de aproximadamente 90 a aproximadamente 80 mg/dL, en relación con los niveles de glucosa en sangre en ayunas de un sujeto antes de la administración de cualquiera de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento, o en comparación con sujetos de control que no reciben ninguno de los conjugados, compuestos, composiciones, formas, medicamentos o combinaciones de la invención descrita en este documento.

[0177] La presente invención proporciona los conjugados de la invención para su uso en un método de modulación de la actividad del receptor Y2 en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, "modular" se refiere a aumentar o disminuir la actividad del receptor.

[0178] En algunas formas de realización, se administra una cantidad eficaz de un conjugado o compuesto de la invención o una forma, composición o medicamento del mismo a un sujeto que lo necesita una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, seis veces al día, siete veces al día u ocho veces al día. En otras formas de realización, se administra una cantidad eficaz de un conjugado o compuesto de la invención o una forma, composición o medicamento del mismo a un sujeto que lo necesita una vez cada dos días, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, dos veces al mes, tres veces al mes o cuatro veces al mes.

[0179] Otra forma de realización de la invención comprende los conjugados de la invención para su uso en un método para prevenir, tratar, retrasar la aparición de, o mejorar una enfermedad, trastorno o síndrome, o uno o más síntomas de cualquiera de dichas enfermedades, trastornos o síndromes en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención en una terapia de combinación. En ciertas formas de realización, la terapia de combinación es un segundo agente terapéutico. En ciertas formas de realización, la terapia de combinación es una terapia quirúrgica.

[0180] Como se utiliza en el presente documento, el término "en combinación", en el contexto de la administración de dos o más terapias a un sujeto, se refiere al uso de más de una terapia.

[0181] Como se utiliza en el presente documento, la terapia de combinación se refiere a administrar a un sujeto que lo necesita uno o más agentes terapéuticos adicionales, o una o más terapias quirúrgicas, simultáneamente con una cantidad eficaz de un conjugado o compuesto de la invención o una forma, composición o medicamento del mismo. En algunas formas de realización, el uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias quirúrgicas se pueden administrar el mismo día que una cantidad eficaz de un conjugado de la invención, y en otras formas de realización, el uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias quirúrgicas se pueden administrar en la misma semana o el mismo mes que una cantidad eficaz de un conjugado o compuesto de la invención.

[0182] En ciertas formas de realización, en las que la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y dislipidemia, el segundo agente terapéutico puede ser un agente antidiabético. En ciertas formas de realización, el agente antidiabético puede ser un modulador del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1).

[0183] La presente invención también contempla los conjugados de la invención para su uso en la prevención, tratamiento, retraso de la aparición de, o mejora de cualquiera de las enfermedades, trastornos, síndromes o síntomas descritos en este documento en un sujeto que lo necesite con una terapia de combinación que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención, en combinación con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (por ejemplo, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina, etc.); un agonista del receptor de GLP-1 (p. ej., agonistas del receptor de GLP-1 de acción corta como exenatida y lixisenatida; agonistas del receptor de GLP-1 de acción intermedia como liraglutida; agonistas del receptor de GLP-1 de acción prolongada como exenatida de liberación prolongada, albiglutida, dulaglutida); un inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa-2 (SGLT-2) (p. ej., canaglifozina, dapaglifozina, empaglifozina, etc.); secuestradores de ácidos biliares (p. ej., colesevelam, etc.); agonistas del receptor de dopamina (p. ej., bromocriptina de liberación rápida); biguanidas (p. ej., metformina, etc.); insulina; oxintomodulina; sulfonilureas (p. ej.,

clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, glibenclamida, glibornurida, glisoxepida, glicopiramida, tolazamida, tolbutamida, acetohexamida, carbutamida, etc.); y tiazolidinedionas (p. ej., pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona, ciglitazona, darglitazona, englitazona, netoglitazona, rivoglitazona, troglitazona, etc.). En algunas formas de realización, la dosis del o los agentes terapéuticos adicionales se reduce cuando se administran en combinación con un conjugado o compuesto de la invención. En algunas formas de realización, cuando se usan en combinación con un conjugado o compuesto de la invención, el o los agentes terapéuticos adicionales se pueden usar en dosis más bajas que cuando cada uno se usa individualmente.

[0184] En ciertas formas de realización, en donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico (es decir, síndrome X), resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa deteriorada (por ejemplo, intolerancia a la glucosa), hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética y otros factores de riesgo cardiovascular tales como hipertensión y factores de riesgo cardiovascular relacionados con niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema, el segundo agente terapéutico puede ser liraglutida.

[0185] La presente invención contempla los conjugados de la invención para su uso en la prevención, tratamiento, retraso de la aparición o mejora de cualquiera de las enfermedades, trastornos, síndromes o síntomas descritos en el presente documento en un sujeto que lo necesite, con una terapia de combinación que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado, compuesto o composición farmacéutica de la invención en combinación con una terapia quirúrgica. En ciertas formas de realización, la terapia quirúrgica puede ser cirugía bariátrica (por ejemplo, cirugía de bypass gástrico, como cirugía de bypass gástrico Roux-en-Y; gastrectomía en manga; cirugía de banda gástrica ajustable; derivación biliopancreática con cruce duodenal; balón intragástrico; plicatura gástrica; y combinaciones de las mismas).

[0186] En formas de realización en las que el uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias quirúrgicas se administran el mismo día que una cantidad eficaz de un conjugado o compuesto de la invención, el conjugado o compuesto de la invención se puede administrar antes, después o simultáneamente con el agente terapéutico adicional o la terapia quirúrgica. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administran las terapias a un sujeto. Por ejemplo, una primera terapia (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento) se puede administrar antes (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con o posteriormente (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un sujeto.

EJEMPLOS

SÍNTESIS

[0187] Los compuestos o conjugados de la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos sintéticos generales conocidos por los expertos en la materia. La siguiente descripción de la síntesis tiene fines ilustrativos y no pretende en ningún caso ser un límite de la invención.

[0188] Los análogos o derivados del PYY cíclico de NTSC (NTSC-PYY) de esta invención pueden sintetizarse mediante una variedad de procedimientos convencionales conocidos para la formación de enlaces peptídicos sucesivos entre aminoácidos, y se llevan a cabo preferentemente mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), como se describe generalmente por Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149-2154), utilizando un sintetizador de péptidos automatizado, síntesis de laboratorio tradicional o una combinación de ambos enfoques. Los procedimientos convencionales para la síntesis de péptidos implican la condensación entre el grupo amino libre de un residuo de aminoácido, cuyas otras funcionalidades reactivas se han protegido adecuadamente, y el grupo carboxilo libre de otro aminoácido, cuyas funcionalidades reactivas también se han protegido adecuadamente. Los ejemplos de agentes de condensación utilizados típicamente para la formación de enlaces peptídicos incluyen diisopropilcarbodiimida (DIC) con o sin 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) o ciano(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxyma Pure), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HBTU), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HATU), hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU), hexafluorofosfato de 1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyOxim), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrafluoroborato de tetrametilaminio (TBTU), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP) y similares.

[0189] La metodología sintética automatizada de péptidos se puede llevar a cabo a temperatura ambiente (ta), o a temperaturas elevadas, preferiblemente a través de la aplicación de calentamiento por microondas, como lo describe Yu (J. Org. Chem., 1992, 57, 4781-4784) y como lo refinó más recientemente Palasek (J. Pept. Sci., 2007, 13, 143-148).

[0190] Los compuestos de la presente invención (amidas C-terminales) se pueden preparar convenientemente utilizando la metodología de aminoácidos protegidos con N- α -Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo), mediante la cual el extremo carboxiterminal de un aminoácido protegido con N- α -Fmoc adecuadamente protegido se acopla a una resina de fase sólida convencional utilizando un agente de acoplamiento adecuado. Las resinas de fase sólida convencionales adecuadas, disponibles comercialmente, incluyen resina de amida Rink MBHA, resina de amida Rink AM, resina Tentagel S RAM, resina Fmoc-PAL-PEG PS, resina de amida SpheriTide Rink, resina ChemMatrix Rink, resina de amida Sieber, resina TG Sieber y similares. El aminoácido Fmoc unido a la resina se puede desproteger luego mediante exposición a 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF) o 1-metil-2-pirrolidona (NMP), cuyo tratamiento sirve para eliminar selectivamente el grupo protector Fmoc. Posteriormente, se acoplan y desprotegen secuencialmente otros aminoácidos protegidos por Fmoc, lo que genera el péptido protegido unido a la resina deseado. En ciertos casos, puede ser necesario utilizar un grupo protector reactivo ortogonalmente para otra amina en la secuencia del péptido que resista las condiciones de desprotección de Fmoc. En tales casos, se pueden utilizar eficazmente grupos protectores como 4-metiltrilito (Mtt) o 4-metoxitritilo (Mmt), ambos eliminables mediante tratamientos con ácido trifluoroacético (TFA) al 1 %/diclorometano (DCM), o preferiblemente aliloxycarbonilo (alloc), eliminable mediante tratamiento con Pd(PPh₃)₄ (tetraquis(trifenilfosfina)paladio(0))/PhSiH₃ (fenilsilano)), 1-(4,4-dimetil-2,6dioxociclohex-1-iliden)etilo (Dde), eliminable mediante tratamiento con hidrazina al 2-3 %/DMF y 1-(4,4-dimetil-2,6dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo (ivDde), eliminable mediante tratamiento con hidrazina al 2-3 %/DMF).

[0191] En las metodologías sintéticas de péptidos convencionales, las cadenas laterales reactivas de los alfa aminoácidos se protegen generalmente durante toda la síntesis con grupos protectores adecuados para volverlas inertes a los protocolos de acoplamiento y desprotección. Si bien en la técnica se conocen múltiples grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos, en este documento los siguientes grupos protectores son los más preferidos: terc-butilo (t-Bu) para serina, treonina, ácido glutámico, ácido aspártico y tirosina; trilito (Trt) para asparagina, glutamina, cisteína, homocisteína e histidina; terc-butiloxycarbonilo (Boc) para triptófano y el grupo ϵ -amino de la lisina; y 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para arginina. Estos grupos protectores se eliminan tras un tratamiento con ácido fuerte, como con altas concentraciones de ácido trifluoroacético (TFA).

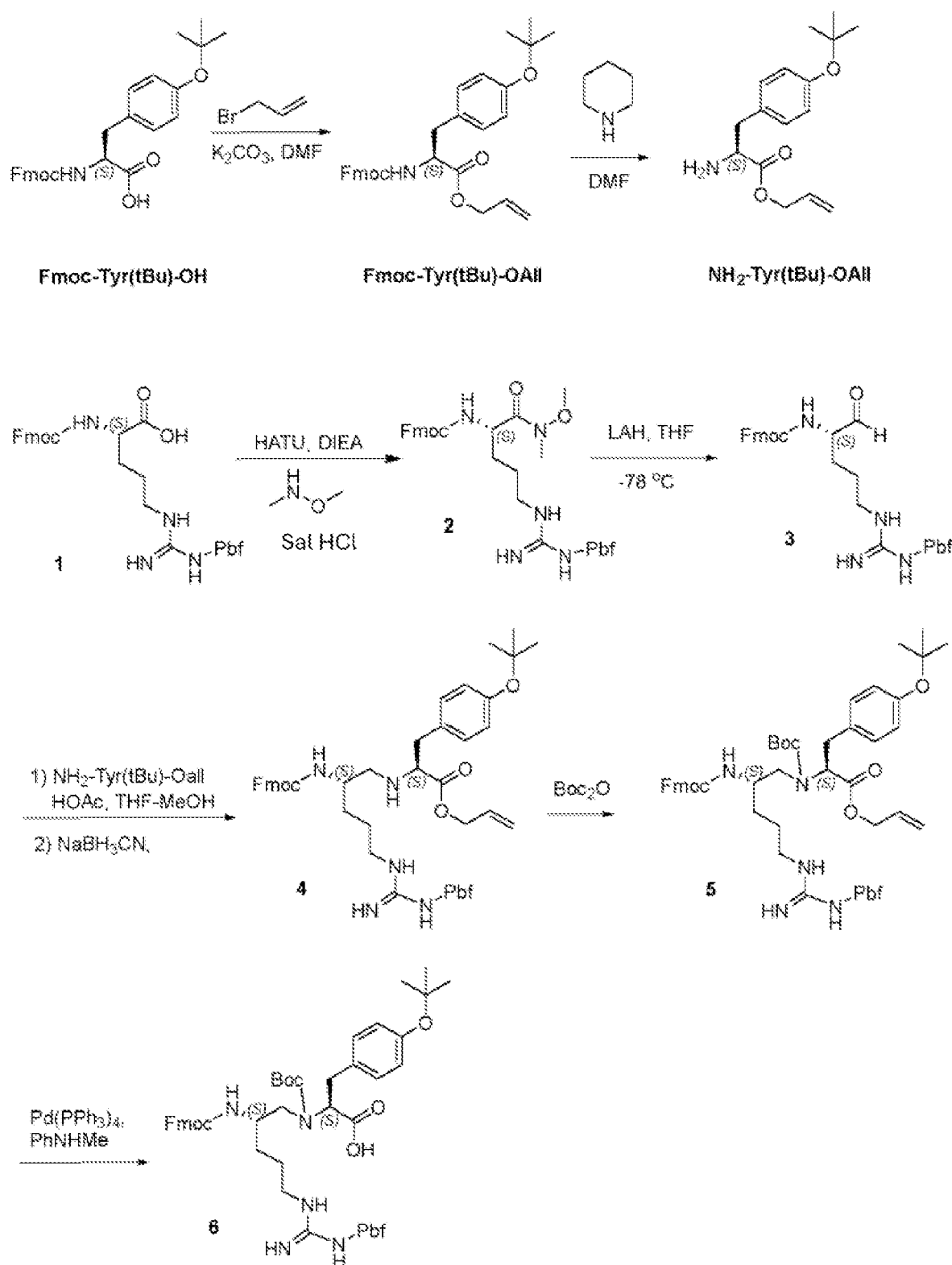
[0192] Una vez finalizado el SPPS, el péptido protegido por la cadena lateral unido a la resina se desprotege y se escinde concomitantemente de la resina utilizando un cóctel de escisión que consiste predominantemente en (TFA) junto con varias combinaciones de eliminadores de carbocationes, como triisopropilsilano (TIPS), agua, fenol y anisol. El péptido sólido crudo se aísla luego por precipitación del filtrado del péptido/cóctel con éter frío. En el caso especial de péptidos protegidos unidos a la resina de Sieber, la escisión del péptido protegido de la resina se puede efectuar ventajosamente mediante un tratamiento repetido con 1-2 % de TFA en DCM sin causar desprotecciones de la cadena lateral. Una vez aislado, se pueden llevar a cabo manipulaciones adicionales del péptido protegido en reacciones en fase de solución. Finalmente, el péptido protegido se puede desproteger globalmente utilizando un tratamiento separado con el cóctel de escisión y precipitar como se describió anteriormente. El péptido crudo así obtenido se disuelve a baja concentración (aprox., < 4 mg/mL) en un sistema de disolventes en gran parte acuoso (aq) que contiene un codisolvente orgánico como acetonitrilo o etanol. Al elevar el pH de la solución a > 5, el péptido sufre una reacción de ciclización intramolecular para formar el análogo de NTSC PYY crudo correspondiente de la presente invención. Los análogos de NTSC PYY así formados pueden purificarse utilizando técnicas de purificación generalmente conocidas en la técnica. Un método preferible de purificación de péptidos utilizado en este documento es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa. Los péptidos purificados se caracterizan a continuación mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS).

ESQUEMAS GENERALES

[0193] Un procedimiento sintético general para la síntesis de péptidos NTSC-PYY de amida C-terminal se describe en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N.º 62/413.613, presentada el 27 de octubre de 2016 y la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º, titulada "Compuestos de tirosina de péptidos cíclicos como moduladores de receptores de neuropéptidos", presentada el mismo día que esta solicitud 15 con el expediente del abogado N.º PRD3411.

Ejemplo 1: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 1

[0194]

Esquema 14. Síntesis de Fmoc-*psi*-[Arg(Pbf)]-(N-Boc)Tyr(tBu)]-OH**1. Síntesis de Fmoc-*psi*-[Arg(Pbf)]-(N-Boc)Tyr(tBu)]-OH**A. Síntesis de H₂N-Tyr(tBu)-OAll

[0195] A una solución enfriada con hielo de Fmoc-Tyr(tBu)-O (69 g, 150,15 mmol) y K₂CO₃ (62 g, 445,36 mmol) en DMF (500 mL) se añadió bromuro de alilo (72 g, 595,16 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante 3 h. A continuación, se añadió hielo/agua (1 L) y la mezcla se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida para producir Fmoc-Tyr(tBu)-OAll como un aceite amarillo. A una solución enfriada con hielo de Fmoc-Tyr(tBu)-OAll (70 g, 140,1 mmol) en DMF (600 mL) se añadió piperidina (150 mL) gota a gota durante un período de 20 min. Después de 3 h la solución de reacción se vertió en agua/hielo (1 L) y se extrajo con EtOAc (2 × 2 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con EtOAc/éter de petróleo (10:1) para proporcionar 34 g de H₂N-Tyr(tBu)-OAll como un aceite amarillo. B. Síntesis de Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe (**2**)

[0196] A una mezcla enfriada con hielo de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**1**) (64,8 g, 99,88 mmol), clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (20 g, 206,2 mmol) y HATU (57 g, 149,91 mmol) en DCM (500 mL) se añadió DIEA (52 g, 402,2 mmol) gota a gota durante un período de 10 min, y la mezcla resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la reacción se vertió en agua/hielo (1 L) y se extrajo con DCM (1 L). Los extractos orgánicos se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida para proporcionar 70 g de Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe crudo (**2**) como un sólido amarillo, que se utilizó sin purificación adicional.

C. Síntesis de Fmoc-Arg(Pbf)-CHO (**3**)

[0197] A una solución enfriada (-78 °C) de LAH en THF (1 M, 107 mL, 0,107 mmol) bajo una atmósfera inerte de nitrógeno se añadió a través de una cánula una solución enfriada (-50 °C) de Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe (**2**) (50 g, 72,3 mmol) en THF (100 mL) gota a gota durante un período de 1 h. Después de agitar a -78 °C durante 5 h, la mezcla se vertió en una solución de HCl 1 N (300 mL), y se añadió HCl 1 N adicional según fuera necesario para ajustar el pH a 4, y luego se extrajo con EtOAc (2 × 2 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida para proporcionar 45 g de Fmoc-Arg(Pbf)-CHO crudo (**3**) como un sólido amarillo, que se utilizó sin purificación adicional.

D. Síntesis de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Tyr(tBu)]-OAll (**4**)

[0198] A una solución enfriada con hielo de Fmoc-Arg(Pbf)-CHO (**3**) del paso C (45 g, 71,12 mmol) y H₂N-Tyr(tBu)-OAll del paso A (32 g, 115,37 mmol) en THF (200 mL), MeOH (200 mL) y HOAc (15 mL) se añadió cianoborohidruro de sodio (18,0 g, 286,4 mmol) en porciones durante un período de 30 min, y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se extinguió mediante la adición de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (500 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 × 2 L). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc/éter de petróleo (10:1) para proporcionar 40 g de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Tyr(tBu)]-OAll (**4**) como un sólido amarillo.

E. Síntesis de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OAll (**5**)

[0199] A una solución de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-OAll] (**4**) (53 g, 59,28 mmol) en MeCN (240 mL) se añadió di-terc butil-dicarbonato (20 g, 91,3 mmol) y la solución resultante se agitó a 50 °C durante la noche. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc/éter de petróleo (1:1) para proporcionar 32 g de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OAll (**5**) como un sólido amarillo.

F. Síntesis de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OH (**6**)

[0200] A una solución enfriada (-30 °C) de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OAll (**5**) (32 g, 32 mmol) en DCM (600 mL) bajo una atmósfera inerte de nitrógeno se añadió Pd(PPh₃)₄ (3,0 g, 4,33 mmol), seguido de la adición gota a gota de N-metilanilina (10 g, 93 mmol) durante un periodo de 30 min. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y luego se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con EtOAc/éter de petróleo (1:1) para proporcionar 26,8 g de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OH (**6**) como un sólido amarillento. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,75-7,77 (2H, m), 7,59-7,60 (2H, m), 7,32-7,33 (4H, m), 7,09-7,11 (2H, m), 6,87-7,00 (2H, m), 4,27-4,50 (3H, m), 3,30-3,50 (4H, m), 3,02-3,23 (3H, m), 2,75-2,98 (3H, m), 2,57 (3H, s), 2,48 (3H, s), 2,00 (3H, s), 1,31-1,41 (28H, m). LC/MS (ES, m/z): masa calculada para C₅₂H₆₇N₅O₁₀S: 953,46, hallada: 954,55 [M+H]⁺.

2. Carga del dipéptido Fmoc-psi-(R35-N(Boc)-Y36) sobre resina Sieber

[0201] En un recipiente de reacción de microondas fritado (suministrado por CEM Corporation), la resina NovaSyn TG Sieber (suministrada por Novabiochem) (0,2 mmol) se trató con 20 % de piperidina en DMF (10 ml) y se calentó a 50 °C durante 2,5 min en un reactor de microondas CEM. La reacción se drenó y la resina se lavó con DMF y se trató nuevamente con 20 % de piperidina en DMF a 50 °C durante 5 min en un reactor de microondas CEM. Después de drenar y lavar la resina con DMF, el tratamiento de desprotección se repitió una vez más. La resina se trató luego con una solución de Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OH obtenida anteriormente (3-5 eq.), HATU (2,75 - 4,8 eq.) y DIEA (6 - 10 eq.) en DMF (4 mL) y se mezcló a rt durante 6 a 24 h. La mezcla se drenó y la resina se lavó extensamente con DMF, y luego se tapó mediante un tratamiento con 20 % Ac₂O en DMF (5 mL) en condiciones de microondas a 50 °C durante 5 min. La reacción se drenó y la resina se lavó extensamente con DMF y DCM

3. Síntesis de Fmoc-βA-IKPEAPGEK(Alloc)ASPEELNRYYASLRHYLNL(hC) TRQ(psi-R35Y36)-Resina Sieber

[0202] Las extensiones de aminoácidos sobre la resina precargada (psi-R35, Y36)-resina Sieber (0,2 mmol) se realizaron en un sintetizador de péptidos CEM Liberty Blue Microwave. Los aminoácidos protegidos con α-Fmoc estándar se acoplaron doblemente en un exceso de 3,8 veces con respecto a la carga de resina inicial a 50 °C durante 15 min utilizando HBTU/DIEA como agentes de acoplamiento. Fmoc-Arg(Pbf)-OH se acopló doblemente utilizando un protocolo de dos etapas: 25 min a temperatura ambiente seguido de 15 min a 50 °C, y Fmoc-His(Trt)-OH se acopló doblemente utilizando un protocolo de dos etapas: 4 min a temperatura ambiente seguido de 8 min a 50 °C.

4. Síntesis de Fmoc-βAIKPEAPGEK(NH₂)ASPEELNRYYASLRHYLNL(hC) TRQ(psi-R35Y36)-Resina Sieber: desprotección Alloc

[0203] La resina resultante de lo anterior se trató con una solución de fenilsilano (25 eq.) en DCM desoxigenado (10 mL). Después de agitar durante ~ 2 min, se añadió una solución de Pd(PPh₃)₄ (0,5 eq.) en DCM (10 mL) y la mezcla de resina se agitó durante 30 min bajo argón. La reacción se drenó y la resina se lavó con DCM desoxigenado. La desprotección se repitió con reactivos nuevos, después de lo cual la reacción se drenó y la resina se lavó exhaustivamente con DCM y DMF.

5. Síntesis de Fmoc-βA-IKPEAPGEK(NH-dPEG₁₂-NH-Fmoc)ASPEELNRYYASLRHYLNL(hC)TRQ(psi R35Y36)-Resina Sieber: acoplamiento de ácidos carboxílicos N-Fmoc dPEG₁₂ sobre 11K

[0204] La resina de Sieber de péptido desprotegido Alloc de arriba se trató con una solución del ácido carboxílico N-Fmoc-dPEG₁₂ (5 eq), HBTU (4,8 eq.) y DIEA (10 eq.) en DMF (7 mL) en un reactor de microondas CEM a 50 °C durante 15 min, momento en el que la reacción mostró una prueba de Kaiser negativa. La reacción se drenó y la resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM.

6. Síntesis de BrCH₂COHN-βA-IKPEAPGEK(NH-dPEG₁₂-NHCOCH₂Br)ASPEEL NRYYASLRHYLNL(hC) TRQ(psi-R35Y36)-Resina Sieber: bis-bromoacetilación en βA y dPEG₁₂

[0205] La resina anterior se sometió a desprotección con Fmoc utilizando piperidina fresca al 20 % en DMF a 50 °C durante 5 min en un reactor de microondas CEM. La desprotección se repitió dos veces. La resina peptídica desprotegida con Fmoc así obtenida se trató con una solución de anhídrido bromoacético (20 eq.) en DMF (5 ml) en un reactor de microondas CEM a 50 °C durante 10 min, momento en el que la reacción mostró una prueba de Kaiser negativa. La reacción se drenó y la resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM, y luego se secó.

7. Síntesis de BrCH₂COHN-βA-IKPEAPGEK(NH-dPEG₁₂-NHCOCH₂Br)ASPEEL NRYYASLRHYLNL(hC) TRQ(psi-R35Y36)-CONH₂: escisión de la resina y desprotección global

[0206] La resina seca se trató con una solución de 1,5 % de TFA en DCM (10 mL) y se mezcló durante 5 a 10 min, luego se filtró. Este tratamiento se repitió 9 veces más utilizando un cóctel nuevo para cada tratamiento. Luego, los filtrados combinados se combinaron y se concentraron para proporcionar el péptido protegido crudo como una espuma amarilla. Esta espuma se trató con 20 mL de cóctel de escisión (TFA/fenol/H₂O/TIPS = 88/5/5/2) a temperatura ambiente durante 2,5 h y luego se concentró bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de ~2,5 mL, luego se agregó éter frío (40 mL) para precipitar el péptido. La mezcla se centrifugó (5 min; 5000 rpm) y se decantó. Este proceso se repitió 2 veces más para proporcionar el péptido crudo como un polvo blanquecino.

[0207] Como alternativa, la resina se trató con un cóctel de escisión sin tratamiento previo con 1-2 % de TFA en DCM para proporcionar el péptido completamente desprotegido.

8. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 1: procedimiento de ciclización A y purificación

[0208] El péptido crudo de arriba se disolvió en MeCN desoxigenado al 50 %/agua (5-10 mg/mL), se añadió EDTA (1 mM) opcionalmente. El pH de la solución de reacción se elevó luego a aproximadamente 8 mediante la adición de una solución de NaHCO₃ al 7,5 % p/v. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 a 2,5 h, y luego se acidificó a pH < 1 mediante la adición de TFA. La solución se concentró luego a presión reducida a temperatura ambiente hasta aproximadamente la mitad del volumen original (~24 ml). La solución resultante se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. Las purificaciones se realizaron en un sistema de purificación Gilson HPLC 2020 Personal utilizando una columna Varian Pursuit XRs C₁₈ (30 x 250 mm, 100 Å, 5 µm). La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y el tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 20 % de B y una concentración final del 50 % de B durante 36 min. La detección UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones que contenían el producto se analizaron mediante HPLC analítico en un sistema HPLC Agilent 1100 utilizando el mismo tipo de columna que el anterior (4,6 x 250 mm, 5 µm). Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el producto como un sólido similar al algodón. LCMS: 1225,5 (M+4H)/4, 1633,4 (M+3H)/3 y 2450,0 (M+2H)/2 para el pico del producto a los 12,27 min (LC: columna Atlantis T3 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm, 1,0 ml/min, gradiente de 15-60 %).

Ejemplo 2: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 2

1. Síntesis de resina H₂N-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

[0209] La resina de peptidilo protegida se sintetizó utilizando la estrategia Fmoc como se describió anteriormente en un sintetizador de péptidos CEM Liberty Blue Microwave utilizando resinas de amida Rink de baja carga, preferiblemente, resina Fmoc-PAL-PEG PS (aproximadamente 0,16 - 0,2 meq/g, suministrada por Applied Biosystems) en una escala de 0,1 mmol, como se muestra en el Esquema 1. Los aminoácidos protegidos con Fmoc estándar se acoplaron en un exceso de 5 veces en relación con la carga de resina utilizando DIC/Oxyma como agentes de acoplamiento y una temperatura de reacción de aproximadamente 90 °C durante 4 min. Fmoc-Arg(Pbf)-OH se acopló doblemente a 90 °C durante 4 min cada vez y Fmoc-His(Trt)-OH se acopló utilizando un protocolo de dos etapas: 4 min a temperatura ambiente seguido de 8 min a 50 °C. Se llevaron a cabo desprotecciones de Fmoc simples utilizando piperidina al 20 % en DMF (solución de desprotección) a 90 °C durante 1,5 min.

2. Síntesis de resina *m*-BrCH₂PhCOHNIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

[0210] El péptido-resina desprotegido con Fmoc (0,1 mmol) del ejemplo anterior se trató con una solución de ácido *m*-bromometilbenzoico (20 eq.) y DIC (10 eq.) en DMF (4 mL) en un reactor de microondas a 75 °C durante 15 min, momento en el que se determinó que la reacción estaba generalmente completa, según una prueba de ninhidrina de Kaiser (Kaiser, et al., Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598). En los casos en los que se determinó que el acoplamiento era incompleto, el acoplamiento se repitió con reactivos nuevos. La reacción se drenó y la resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM.

3. Síntesis de *m*-BrCH₂PhCOHNIKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC)TRQRY-CONH₂: desprotección y escisión de la resina

[0211] La resina anterior se trató luego con un cóctel de escisión (escala de 10 mL/0,1 mmol) que consistía en TFA/agua/fenol/TIPS (88:5:5:2) y se calentó en un reactor de microondas a 38 °C durante 40 min, luego se filtró. La resina se lavó con TFA y los filtrados combinados se concentraron bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de aproximadamente 2,5 mL y el péptido se precipitó mediante la adición de éter dietílico frío (40 mL). La suspensión de péptido/éter se centrifugó y la capa de éter se decantó. El sedimento de péptido se resuspendió en éter, se centrifugó y se decantó, y este proceso se repitió una tercera vez. El péptido crudo así obtenido se secó bajo una corriente de nitrógeno suave.

4. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO:2: procedimiento de ciclización A y purificación

[0212] El péptido crudo de arriba se disolvió en MeCN desoxigenado/agua (60 % MeCN) a una concentración de ≤ 4 mg/mL. El pH de la solución de péptido se elevó luego a ca. 7 - 9 mediante la adición de NH₄OAc acuoso (200 mM, pH 8,4) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó la ciclización, según LCMS (normalmente, 3-4 h). La mezcla de reacción de ciclización se acidificó a pH 1,5 - 3 mediante la adición de TFA, y la solución se concentró para eliminar la mayor parte del codisolvente orgánico hasta un punto en el que se produjo un ligero enturbiamiento. Se añadió nuevamente una cantidad mínima de MeCN según fuera necesario para hacer que la mezcla fuera homogénea y la solución resultante se purificó luego directamente mediante HPLC preparativa en múltiples inyecciones utilizando una columna C₁₈ Varian Pursuit XRs C18 (21×250 mm, 100Å, 5 µm). La fase móvil consistió en eluciones en gradiente del tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y el tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que iban desde una concentración inicial del 20 % de B hasta una concentración final del 40 % de B durante 45 min. La detección por UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones que contenían el producto se analizaron mediante HPLC analítico en un sistema HPLC Agilent 1100 utilizando una columna adecuada. Las fracciones puras se combinaron, se concentraron para eliminar la mayor parte de la fase orgánica y luego se liofilizaron.

Ejemplo 3: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 3**1. Síntesis de (H₂N)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(azido-norLeu)-TRQRYPAL-PEG**

[0213] El péptido unido a resina se preparó en una escala de 0,1 mmol de acuerdo con el método descrito en el **Ejemplo 2**, paso 1, sustituyendo Fmoc-azidonorLeu-OH en lugar de Fmoc-hCys(trt)-OH en la posición 31.

2. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(azido-norLeu)-TRQRYPAL-PEG

[0214] El ácido 4-pentinoico se acopló a la resina anterior en condiciones de microondas utilizando un protocolo DIC/HOBT (75 °C, 10 min). Se drenó la reacción y se lavó la resina exhaustivamente con DMF y DCM.

3. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(azido-norLeu)-TRQRYPALCONH₂

[0215] La resina anterior se trató con 10 mL de cóctel de escisión que consistía en TFA/DODT/H₂O/TIS (92,5:2,5:2,5:2,5) en condiciones de microondas (38 °C, 40 min). La reacción se drenó y la resina se lavó con TFA (10 mL). A continuación, el filtrado combinado se concentró en una corriente de nitrógeno hasta un volumen de ~2,5 mL. A continuación, se añadió

éter frío (40 ml) para precipitar el péptido y la mezcla se centrifugó (5 min; 5000 rpm) y se decantó. Este proceso se repitió 2 veces más para dar el péptido crudo como un polvo blanquecino.

4. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 3

[0216] Preparar 7 mg de CuSO₄ en 2 mL de H₂O desoxigenada. Preparar 30 mg de TBTA en 5,4 mL de EtOH y 0,6 mL de MeCN. Premezclar 0,94 mL de solución de CuSO₄ y 4,8 mL de solución de TBTA. Preparar 30 mg de ascorbato de sodio en 3 mL de H₂O desoxigenada.

[0217] A una solución del péptido crudo que contiene azido del Paso 3 (100 mg) en 20 mL de agua desoxigenada se le añadió la solución premezclada de CuSO₄/TBTA seguida de 2,4 mL de solución de ascorbato de Na (la solución se tornó inmediatamente lechosa). La mezcla se calentó a 40 °C y se agitó durante 1,5 h, momento en el que el análisis LCMS indicó una reacción completa. La mezcla se diluyó a ~40 mL con agua (0,1 % TFA); la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. Las purificaciones se realizaron utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a 35 °C. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 10 % de B hasta una concentración intermedia del 18 % de B (21 mpm) y luego hasta una concentración final del 33 % de B (10,5 mpm) durante 35 min. La detección UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones que contenían el producto se analizaron mediante HPLC analítico en un sistema HPLC Agilent 1100 utilizando el mismo tipo de columna que el anterior (4,6 × 250 mm, 5 µm). Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el producto como un sólido similar al algodón.

Ejemplo 4: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 4

1. Síntesis de (Dde)K(NH₂)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

[0218] El péptido unido a resina se preparó utilizando el método descrito en el **Ejemplo 2**, paso 1.

2. Síntesis de (Dde)K(NH-Glu-(OtBu)NH₂)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

[0219] Fmoc-Glu-OtBu (5 eq.) se acopló a la resina anterior en condiciones de microondas utilizando métodos de acoplamiento DIC/Oxyma (90 °C, 6 min; dc). La resina se drenó y se lavó con DMF. Luego se llevó a cabo la desprotección de Fmoc utilizando piperidina al 20 % en DMF utilizando un protocolo de 3 etapas (75 °C durante 0,5 min; 75 °C durante 3 min; 75 °C durante 3 min) con lavados con DMF en cada etapa.

3. Síntesis de (Dde)K(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC)TRQRY-PAL-PEG

[0220] El ácido palmítico (5 eq.) se acopló a la resina anterior en condiciones de microondas utilizando métodos de acoplamiento DIC/Oxyma (90 °C, 5 min). La resina se drenó y se lavó abundantemente con DMF y DCM.

4. Síntesis de (H₂N)K(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC)TRQRY-PAL-PEG

[0221] Después de lavar la resina anterior con DMF, se trató con una solución de hidrazina al 2 % en DMF (6 mL/0,1 mmol de resina) a temperatura ambiente durante 5 min, luego se drenó y se lavó con DMF. El tratamiento se repitió 5 veces más.

5. Síntesis de (H₂N)IKPEAPGEK(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC)TRQRY-PAL-PEG

[0222] Los acoplamientos de aminoácidos restantes se llevaron a cabo utilizando el método descrito en el **Ejemplo 2**, paso 1.

6. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 4

[0223] El resto de la síntesis se llevó a cabo utilizando los métodos descritos en el **Ejemplo 2**, pasos 2-4. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRS C18 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 23 % de B y una concentración intermedia del 33 % de B (21 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 48 % de B (10,5 mpm) durante 55 min.

Ejemplo 5: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 5

[0224] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** sustituyendo ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en lugar de ácido palmítico en el paso 3. La purificación del producto se realizó utilizando una Columna Agilent 300SB C8 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una

concentración inicial del 35 % de B y una concentración intermedia del 45 % de B (21 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 60 % de B (10,5 mpm) durante 60 min.

Ejemplo 6: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 6

1. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(Dde)-(azido-norLeu)-TRQRYPAL-PEG

[0225] El péptido unido a resina se preparó como se describe en el Ejemplo 3, paso 1, sustituyendo Fmoc-Lys(Dde)-OH en lugar de Fmoc-Leu-OH en la posición 30 e incorporando el ácido 4-pentinoico (doblemente acoplado) en este paso en la posición 2, siguiendo Fmoc-Ile-OH en la posición 3.

2. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH₂)-(azido-norLeu)-TRQRYPAL-PEG

[0226] La resina anterior se trató con 3 % de hidrazina en DMF (escala de 8 mL/0,1 mmol) durante 5 min a temperatura ambiente y luego la mezcla se drenó y se lavó con DMF. Este procedimiento se repitió aproximadamente 5 veces, después de lo cual la resina se lavó exhaustivamente con DMF y luego con DCM.

3. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH-γ-GtuAcVitE)-(azido-norLeu)-TRQRY-PAL-PEG

[0227] Fmoc-Glu-OtBu se acopló a la resina anterior utilizando el protocolo de acoplamiento descrito en el Ejemplo 2, paso 1 con un tiempo de acoplamiento de 5 min. La resina se desprotegió mediante tratamiento con 20 % de piperidina en DMF utilizando un protocolo de microondas de 3 etapas (75 °C, 0,5 min; 75 °C, 3 min; 75 °C, 3 min), después de lo cual la resina se lavó exhaustivamente con DMF y DCM. A continuación, se acopló ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (8) a la resina utilizando el mismo procedimiento utilizado para el acoplamiento FmocGlu-OtBu.

4. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH-γ-GtuAcVitE)-(azido-norLeu)-TRQRY-CONH₂

[0228] La escisión y precipitación del péptido de la resina anterior se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en Ejemplo 3, paso 3.

5. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 6

[0229] El compuesto del título se preparó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, paso 4. La purificación del producto se realizó en una columna Varian Pursuit XRs C8 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 μm) a 35 °C. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de Tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y Tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 35 % B hasta una concentración intermedia de 48 % B (21 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final de 63 % B (10,5 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 7: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 7

[0230] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo K(NH-γ-Glu-Pal) instalado en la posición 9 en lugar de la posición 11. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent 300SB C8 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de Tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y Tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 23 % B a una concentración intermedia de 43 % B (21 mpm) y luego a una concentración final de 43 % B (10,5 mpm) durante 40 min. Las fracciones que contenían el producto impuro se volvieron a purificar en una columna Waters T3 C₁₈ (250 × 19 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente utilizando un gradiente desde una concentración inicial de 25 % B hasta una concentración intermedia de 35 % B (21 mpm) y luego hasta una concentración final de 45 % B (10,5 mpm) durante 80 min.

Ejemplo 8: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 8

[0231] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo K(NH-γ-GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent 300SB C8 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 μm) a 35 °C. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de Tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y Tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 21 % B a una concentración intermedia de 31 % B (21 mpm) y luego a una concentración final de 41 % B (10,5 mpm) durante 40 min. Las fracciones que contenían producto impuro se volvieron a purificar en una columna Waters T3 C₁₈ (250 × 19 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente utilizando un gradiente desde una concentración inicial de 21 % B hasta una concentración intermedia de 31 % B (21 mpm) y luego hasta una concentración final de 40 % B (10,5 mpm) durante 80 min.

Ejemplo 9: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO 9**1. Síntesis de resina H₂NIKPEAPGEDASPEELNRYRYASLRHYLNL(hC) TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber**

[0232] Las extensiones de aminoácidos sobre la resina Sieber (ψi-R35, Y36) precargada del **Ejemplo 1**, paso 2 (0,1 mmol) se realizaron como se describe en el **Ejemplo 1**, paso 3 con la modificación de utilizar un exceso de 5 veces de aminoácidos protegidos.

2. Síntesis de resina m-BrCH₂PhCOHN-İKPEAPGEDASPEELNRYRYASLRHYLNL(hC)TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber

[0233] El ácido m-bromometilbenzoico se acopló a la resina anterior de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**, paso, con la modificación de que el acoplamiento se llevó a cabo a 50 °C en lugar de 75 °C.

3. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 9

[0234] El compuesto del título se preparó a partir de la resina anterior siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 1**, pasos 7 y 8. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a 35 °C. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de Tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y Tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 10 % de B hasta una concentración intermedia del 18 % de B (21 mpm) durante 10 min, y luego hasta una concentración final del 33 % de B (10,5 mpm) durante 35 min.

Ejemplo 10: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO 10

[0235] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** sustituyendo DdeLys(Fmoc)-OH en lugar de Fmoc-Leu-OH en la posición 30 y ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en lugar de ácido palmítico en el paso 3. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent 300SB C8 (21 × 250 mm, 100Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 30 % B a una concentración intermedia de 40 % B (21 mpm) durante 10 min, y luego a una concentración final de 55 % B (21 mpm) durante 35 min. Las fracciones que contenían el producto impuro se volvieron a purificar utilizando un gradiente modificado desde una concentración inicial de 35 % B hasta una concentración intermedia de 43 % B (21 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final de 58 % B (10,5 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 11: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 11**1. Síntesis de (Alloc)K(NH₂)-(hC)-TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber**

[0236] La resina anterior se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el **Ejemplo 9**, paso 1, utilizando Alloc-Lys(Fmoc)-OH en lugar de Fmoc-Leu-OH en la posición 30.

2. Síntesis de (Alloc)K(NH-γ-Glu-AcVitE)-(hC)-TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber

[0237] Fmoc-Glu-OtBu y ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) (5 eq. cada uno) se acoplaron secuencialmente a la resina anterior utilizando acoplamientos mediados por HBTU/DIEA en condiciones de microondas a 50 °C durante 15 - 20 min.

3. Síntesis de resina H₂NK(NH-γ-Glu-AcVitE)-(hC)-TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber

[0238] El grupo protector alloc se eliminó siguiendo el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**, paso 4.

4. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 11

[0239] El compuesto del título se preparó a partir de la resina anterior siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 9**, pasos 1-3, con la modificación de que se utilizó un tampón TRIS/HCl 1 M, pH 7,5 en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (21 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a 35 °C. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 10 % de B hasta una concentración intermedia del 18 % de B (21 mpm) durante 10 min, y luego hasta una concentración final del 33 % de B (10,5 mpm) durante 35 min.

Ejemplo 12: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 12

[0240] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 2** sustituyendo Fmoc-NMeArg(pbf)-OH en lugar de Fmoc-Arg(pbf)-OH en la posición 35 en el paso 1 y con la modificación de que se utilizó un tampón NaHCO₃ 1 M en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil

consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 10 y el 60 % de B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 13: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 13

[0241] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y con las modificaciones de que se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como se utilizó disolvente en lugar de MeCN/H₂O y solución acuosa saturada de NaHCO₃ en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (NH₄OH 10 mM en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 15 % B a una concentración intermedia de 20 % B (100 mpm) durante 5 min, y luego a una concentración final de 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 14: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 14

[0242] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo Lys(NH- γ -GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11 y con Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH en lugar de Fmoc-Arg(pbf)-OH en la posición 35 en el paso 1 y con la modificación de que se utilizó un tampón NaHCO₃ 1 M en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6, para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 70 % de B (30 mpm) durante 36 min. Las fracciones impuras se volvieron a purificar en una columna de difenilo Varian Pursuit XRs (30 x 100 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente utilizando un gradiente del 30 al 50 % de B (30 mpm) durante 25 min.

Ejemplo 15: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 15

[0243] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo Lys(NH- γ -GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, sustituyendo Fmoc- β Ala-OH en lugar del acoplamiento Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y con las modificaciones de que se utilizó un tampón NaHCO₃ 1M en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización, y se utilizó el acoplamiento con anhídrido bromoacético en lugar de ácido m-bromometilbenzoico en el paso 6 (paso 2) del Ejemplo 2) utilizando el siguiente procedimiento: El péptido-resina desprotegido con Fmoc (0,1 mmol) se trató con una solución de anhídrido bromoacético (10 eq.) en DMF (5 mL) en un reactor de microondas a 50 °C durante 5-10 min, momento en el que se determinó que la reacción generalmente estaba completa según una prueba de ninhidrina de Kaiser. En los casos en los que se determinó que el acoplamiento era incompleto, el acoplamiento se repitió con reactivos nuevos. La purificación del producto se realizó utilizando una Columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de Tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y Tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) con un contenido de B del 20 al 60 % (30 mpm) durante 36 min. Las fracciones impuras se volvieron a purificar en una columna de difenilo Varian Pursuit XRs (30 x 100 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente utilizando un gradiente del 30 al 50 % (30 mpm) durante 25 min.

Ejemplo 16: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 16

[0244] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo Lys(NH- γ -GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, omitiendo el acoplamiento Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y utilizando ácido *p*-bromometilbenzoico en lugar de ácido m-bromometilbenzoico en el paso 6 (paso 2 del Ejemplo 2). Además, se utilizó un tampón NaHCO₃ 1 M en lugar del tampón NH₄OAc, para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una Columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (0,1 % TFA en agua) y tampón B (0,1 % TFA en MeCN) con un contenido de B de entre 20 y 70 % (30 mpm) durante 36 min. Se volvieron a purificar fracciones impuras en una columna de difenilo Varian Pursuit XRs (30 x 100 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente utilizando un gradiente de 30 - 50 % B (30 mpm) durante 25 min.

Ejemplo 17: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 17

[0245] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo Lys(NH- γ -GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11 y Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 1. Se utilizó un tampón TRIS/HCl (1 M, pH 7,5) en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent Polaris C18-A (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y el tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 20 % de B hasta una concentración intermedia del 35 % de B (40 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 45 % de B (40 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 18: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 18

[0246] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con el residuo Lys(NH-γ-GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11 y Fmoc-Glu(OtBu)-OH utilizado en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 1. Se utilizó tampón TRIS/HCl (1 M, pH 7,5) en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent Polaris C18-A (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente. La fase 50 consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 20 % de B y una concentración intermedia del 35 % de B (40 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 45 % de B (40 mpm) durante 40 min.

10 Ejemplo 19: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 19

[0247] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** con Lys(NH-γ-GluPal) 55 residuo instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH en lugar de Fmoc-Arg(pbf)-OH en la posición 35 en el paso 1, Fmoc-Cys(trt)-OH en lugar de Fmoc-hCys(trt)-OH, y utilizando ácido *p*-bromometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 6 (paso 2 del **Ejemplo 2**).

[0248] Se realizó la siguiente modificación al paso 6 (pasos 3 y 4 del **Ejemplo 2**): El péptido crudo obtenido antes para ciclización se purificó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100Å, 5 μm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 70 % de B (30 mpm) durante 36 min. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se trataron con NaHCO₃ sólido para elevar el pH a ~7-8; la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, luego se acidificó a pH 4 con TFA. La solución se concentró a un volumen de 5 a 10 ml y se añadió MeCN para solubilizar cualquier precipitado. La purificación del producto se realizó como se indicó anteriormente, con un gradiente de 20 a 60 % de B (30 mpm) durante 36 min.

25 Ejemplo 20: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 20

[0249] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** con el residuo Lys(NH-γ-GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH en lugar de Fmoc-Arg(pbf)-OH en la posición 35 en el paso 1 y Fmoc-Cys(trt)-OH en lugar de Fmoc-hCys(trt)-OH. El péptido lineal crudo se purificó y se cicló de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

35 Ejemplo 21: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 21

[0250] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** con el residuo Lys(NH-γ-GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-His(trt)-OH en la posición 26 y Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 1. Se utilizó tampón TRIS/HCl (1 M, pH 7,5) en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent Polaris C₁₈-A (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 20 % de B hasta una concentración intermedia del 35 % de B (40 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 45 % de B (40 mpm) durante 40 min.

45 Ejemplo 22: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 22

[0251] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 4** con el residuo Lys(NH-γ-GluPal) instalado en la posición 30 en lugar de la posición 11, Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-His(trt)-OH en la posición 26 y Fmoc-Glu(OtBu)-OH utilizado en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 1. Se utilizó tampón TRIS/HCl (1 M, pH 7,5) en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent Polaris C₁₈-A (30 x 250 mm, 100 Å, 5 μm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 20 % de B y una concentración intermedia del 33 % de B (40 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 43 % de B (40 mpm) durante 40 min.

55 Ejemplo 23: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 23

[0252] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido octadecanodioico, mono-terc-butil éster (disponible en AstaTech, Inc.) en lugar de ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), un protocolo de acoplamiento que emplea HATU/DIEA a 50 °C durante 30 min y NMP como disolvente en lugar de DMF en el paso 2, y acoplando dos unidades de Fmoc-OEG-OH en tándem antes del acoplamiento de Fmoc-Glu-OtBu, en el paso 2. El péptido lineal crudo se purificó y se cicló de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando

un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 24: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 24

[0253] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 23**, utilizando ácido 20-(terbutoxi)-20oxoicosanoico (disponible en Key Organics, Inc.) en lugar de ácido octadecanodioico, éster mono-terc-butílico. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 25: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 25

[0254] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido esteárico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), un protocolo de acoplamiento que emplea HATU/DIEA a 50 °C durante 30 min y NMP como disolvente en lugar de DMF en el paso 2. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 80 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 80 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 26: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 26

[0255] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido araquídico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), un protocolo de acoplamiento que emplea HATU/DIEA a 50 °C durante 30 min y NMP como disolvente en lugar de DMF en el paso 2. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 90 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 90 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 27: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 27

[0256] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 23**, pero omitiendo el acoplamiento de Fmoc-Glu-OtBu después de los acoplamientos en tándem Fmoc-OEG-OH. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 28: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 28

[0257] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), omitiendo el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y utilizando ácido *p*-bromometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 29: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 29

[0258] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), sustituyendo Fmoc- β Ala-OH en lugar de Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y acoplando anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2), utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 30: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 30

[0259] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (8), sustituyendo Fmoc-A β u-OH en lugar de Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y acoplando anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2), utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 31: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 31

[0260] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 23**, utilizando ácido esteárico en lugar de ácido octadecanodioico, éster mono-terc-butílico. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 32: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 32

[0261] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-His(trt)-OH en la posición 26 y Fmoc-Ala-OH utilizado en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 1). Se utilizó tampón TRIS/HCl (1 M, pH 7,5) en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 6 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Agilent Polaris C₁₈-A (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (0,1 % TFA en agua) y tampón B (0,1 % TFA en MeCN) que variaba desde una concentración inicial de 20 % B hasta una concentración intermedia de 35 % B (40 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final de 45 % B (40 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 33: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 33

[0262] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2 y Fmoc-N(Me)-Gln(trt)-OH en lugar de Fmoc-Gln(trt)-OH en la posición 34 en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 1). En este caso, los acoplamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando NMP como disolvente y un protocolo HATU/DIEA (1 h, acoplamiento simple); Fmoc-N(Me)-Gln(trt)-OH y Fmoc-Arg(pbf)-OH se acoplaron doblemente. Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc en dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; temperatura ambiente; 10 min, 15 min). El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 34: Síntesis del análogo cíclico PYY SEQ ID NO: 34

[0263] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, usando ácido palmítico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**), sustituyendo Fmoc-Cys(trt)-OH en lugar de Fmoc-hCys(trt)-OH en la posición 31, ácido 6-Fmoc-aminohexanoico en lugar de Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y acoplando anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el **paso 4** (**Ejemplo 9**, paso 2), usando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. Se usó NaHCO₃ acuoso (2N) en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 70 % de B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 35: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 35

[0264] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 9**, con las siguientes modificaciones: Fmoc-psi-[N-Me-Arg(Pbf)-N(Boc)Tyr(tBu)]-OH, preparado a partir de Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH en lugar de FmocArg(Pbf)-OH, de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**, paso 1, se utilizó en lugar de Fmoc *psi*-[Arg(Pbf)-N(Boc) Tyr(tBu)]-OH (**6**) para preparar la resina Sieber cargada utilizada en este documento; Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-OH (de Péptido Activo) se utilizó en lugar de Leu en la posición 30; se utilizó ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 2; Los acoplamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando NMP como disolvente y se utilizó un protocolo HATU/DIEA (1 h, acoplamiento simple); FmocArg(pbf)-OH se acopló doblemente. Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc en dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; temperatura ambiente; 10 min, 15 min). El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 36: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 36

[0265] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 35**, sustituyendo Fmoc-βAlaOH en lugar de Fmoc-Ile-OH en la posición 3, y acoplando anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2), utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. Se omitió el tratamiento modificado del **Ejemplo 19**. Fmoc-βAla-OH se acopló en condiciones de microondas a 50 °C durante 20 min. Se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 70 % de B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 37: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 37

[0266] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 9**, sustituyendo FmocCys(trt)-OH en lugar de Fmoc-hCys(trt)-OH en la posición 31 y Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-OH (del péptido activo) en lugar de Fmoc-Leu-OH en la posición 30. Además, se añadió Fmoc-Abu-OH a la secuencia en la posición 2, en el paso 1, y se utilizó el acoplamiento con anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 2, utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. Se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 3

para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 70 % de B (30 mpm) durante 36 min.

5 Ejemplo 38: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 38

[0267] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 35**, con las siguientes modificaciones: se añadió Fmoc-βAla-OH a la secuencia en la posición 2, siguiendo el paso 1 utilizando condiciones de microondas a 50 °C durante 20 min, y se utilizó acoplamiento con anhídrido bromoacético en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 2, utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. Se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 80 % de B (30 mpm) durante 36 min.

15 Ejemplo 39: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 39

[0268] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, utilizando ácido araquídico en lugar de ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2. Se utilizó Fmoc-Ser(tBu)-OH en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH en la posición 4 en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 1) y se utilizó ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que variaba desde una concentración inicial de 20 % B hasta una concentración intermedia de 25 % B (100 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final de 40 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 40: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 40

30 1. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASYSLRHYLNK(Dde)-(azido-norLeu)-TRQ(ψiR35Y36)-resina Sieber

[0269] Se llevaron a cabo extensiones de aminoácidos sobre la resina Sieber (*ψi*-R35, Y36) precargada del **Ejemplo 1**, paso 2 (0,1 mmol) a temperatura ambiente utilizando NMP como disolvente, un exceso de 5 veces de aminoácidos protegidos y un protocolo HATU/DIEA (1 h, acoplamiento simple); Fmoc-Arg(pbf)-OH y Fmoc-His(trt)-OH se acoplaron doblemente. Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc de dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; temperatura ambiente; 10 min, 15 min).

40 2. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASYSLRHYLNK(NH₂)-(azido-norLeu)-TRQ(ψiR35Y36)-Sieber

[0270] La resina anterior se trató con hidrazina al 2 % en DMF (escala de 12 ml/0,2 mmol) durante 2 min a temperatura ambiente y luego se drenó la mezcla. Este procedimiento se repitió aproximadamente 4 veces, después de lo cual la resina se lavó exhaustivamente con DMF y luego con DCM.

45 3. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASYSLRHYLNK((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(azidonorLeu)-TRQ(ψi-R35Y36)-resina Sieber

[0271] La resina anterior se acopló con ácido (S)-10,19-dioxo-22-palmitamido-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazatricosanedioico (5 eq.) [preparado de acuerdo con el procedimiento descrito para la síntesis del intermedio 3, sustituyendo el ácido palmítico en lugar del ácido 18-terc-butoxi-18-oxooctadecanoico en el paso G], utilizando un protocolo HBTU/DIEA a temperatura ambiente durante 1,5 h. La resina se drenó y se lavó exhaustivamente con DMF y DCM.

55 4. Síntesis de (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASYSLRHYLNK((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(azido-norLeu)-TRQ(ψi R35Y36)-CONH₂

[0272] La resina seca se trató con una solución de 2 % de TFA en DCM (20 mL) y se mezcló durante 20 min, luego se filtró. Este tratamiento se repitió 2 veces más utilizando un cóctel nuevo para cada tratamiento. Luego, los filtrados combinados se combinaron y se concentraron para proporcionar el péptido protegido crudo como una espuma amarilla. Esta espuma se trató con 20 mL de cóctel de escisión (TFA/H₂O/TIPS = 95/2,5/2,5) a temperatura ambiente durante 2,5 h y luego se concentró bajo una corriente de nitrógeno hasta un volumen de aproximadamente 2,5 mL. Luego, se añadió éter frío (40 mL) para precipitar el péptido y la mezcla se centrifugó (5 min; 5000 rpm) y se decantó. Este proceso se repitió 2 veces más para proporcionar el péptido crudo como un polvo blanquecino.

[0273] Como alternativa, la resina se trató con un cóctel de escisión sin tratamiento previo con 1-2 % de TFA en DCM, para proporcionar directamente el péptido completamente desprotegido. El péptido crudo se purificó por HPLC preparativa de fase inversa utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm). La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (0,1 % de TFA en agua) y tampón B (0,1 % de TFA en MeCN) que oscilaba entre 20 y 70 % de B durante 36 min. La detección UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones que contenían el producto se analizaron por HPLC analítica en un sistema HPLC Agilent 1100 utilizando el mismo tipo de columna que el anterior (4,6 × 250 mm, 5 µm). Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para proporcionar el producto como un sólido similar al algodón. LCMS: 1211,8 (M+4H)/4, 1615,4 (M+3H)/3 y 2422,9 (M+2H)/2 para el pico del producto a los 16,87 min (LC: columna Atlantis T3 C₁₈, 5 µm, 4,6 × 250 mm, 1,0 ml/min, gradiente del 30-60 %).

5. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 40

[0274] Preparar 5,1 mg de CuSO₄ en 1 ml de H₂O. Preparar 10,4 mg de TBTA en 3 ml de EtOH. Premezclar 400 µL de solución de CuSO₄ y 3 ml de solución de TBTA. Preparar 13 mg de ascorbato de sodio en 2 ml de H₂O.

[0275] A una solución del péptido purificado que contiene azido del Paso 4 (37 mg) en 4 ml de HEPES (0,1 M, pH 7,4) se le añadieron 1,7 ml de la solución premezclada de CuSO₄/TBTA seguido de 1 ml de solución de ascorbato de sodio. Se ajustó la relación EtOH/H₂O hasta que la solución de reacción se volviera transparente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se controló mediante HPLC. Después de 30 min, se completó la reacción. La mezcla se ajustó a pH 4 y se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. Las purificaciones se realizaron utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 × 250 mm, 100 Å, 5 µm). La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y el tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 60 % de B durante 36 min. La detección de UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones que contenían el producto se analizaron mediante HPLC analítico en un sistema HPLC Agilent 1100 utilizando el mismo tipo de columna que el anterior (4,6 × 250 mm, 5 µm). Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el producto como un sólido similar al algodón.

Ejemplo 41: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 41

[0276] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 40, sustituyendo el ácido L-glutámico, N-(1-oxohexadecil)-, 1-(1,1-dimetiletilico) éster en lugar del ácido (S)-10,19-dioxo-22-palmitamido-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazatricosanedioico, en el paso 3.

Ejemplo 42: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 42

[0277] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 40, sustituyendo el ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-43,43-dimetil-10,19,24,41-tetraoxo-3,6,12,15,42-pentaoxa-9,18,23-triazatetratetracontanoico (16) (intermedio 2) en lugar del ácido (S)-10,19-dioxo-22-palmitamido-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazatricosanedioico, en el paso 3.

Ejemplo 43 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 43

1. Síntesis de (Alloc)Lys((OEG)₂-γ-GluNH₂)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-resina Sieber

[0278] Se llevaron a cabo extensiones de aminoácidos sobre la resina Sieber (psi-R35, Y36) precargada del **Ejemplo 1**, paso 2 (0,1 mmol) a temperatura ambiente utilizando NMP como disolvente, un exceso de 5 veces de aminoácidos protegidos y un protocolo HATU/DIEA (1 h, acoplamiento simple); se realizó un doble acoplamiento de Fmoc-Arg(pbf)-OH. Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc de dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; temperatura ambiente; 10 min, 15 min).

2. Síntesis de (Alloc)Lys((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-resina Sieber

[0279] El ácido palmítico se acopló a la resina del paso 1, utilizando condiciones de microondas empleando HATU/DIEA a 50 °C durante 20 - 30 min y NMP como solvente.

3. Síntesis de (H₂N)Lys((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-resina Sieber

[0280] El grupo protector alloc de la resina anterior se eliminó siguiendo el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**, paso 4.

4. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 43

[0281] El compuesto del título se preparó a partir de la resina anterior siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 9**, pasos 1-3, utilizando ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 2. El péptido lineal crudo se purificó y se cicló de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 44 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 44

[0282] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 43**, modificado de manera que las unidades Fmoc-OEG-OH en tándem y la unidad Fmoc-Glu-OtBu se incorporaron en el paso 2 en lugar del paso 1. Se utilizó ácido octadecanodioico, mono-terc-butil éster (AstaTech, Inc.) en lugar de ácido palmítico en el paso 2 y la secuencia de lípidos de enlace se instaló en la posición 11 en lugar de la posición 30. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 45 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 45

[0283] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 43**, modificado de manera que se utilizó ácido carboxílico FmocdPEG24 en lugar de las unidades Fmoc-OEG-OH en tándem y se incorporaron, junto con ácido palmítico, en el paso 2. La secuencia de lípidos de enlace se instaló en la posición 11 en lugar de la posición 30. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 90 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 90 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 46 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 46

[0284] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 9**, utilizando Fmoc-Lys(PalGluOtBu)-OH (de péptido activo) en lugar de Leu en la posición 30. Además, se añadió Fmoc-βAla-OH a la secuencia en la posición 2, siguiendo el paso 1 utilizando condiciones de microondas a 50 °C durante 20 min, y se utilizó el acoplamiento con anhídrido bromoacético en lugar de ácido m-bromometilbenzoico en el paso 2, utilizando la modificación descrita en el **Ejemplo 15**. Sólido El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 47 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 47

[0285] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 44**, instalando la secuencia de lípidos del enlazador en la posición 7 en lugar de la posición 11. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Varian Pursuit XRs C18 (30 x 250 mm, 100 Å, 5 µm) a temperatura ambiente. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 60 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 60 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 48 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 48

[0286] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 43**, utilizando ácido octadecanodioico, mono-terc-butil éster (AstaTech, Inc.) en lugar de ácido palmítico en el paso 2 con un tiempo de acoplamiento de 30 min, e instalando la secuencia de lípidos del enlazador en la posición 22 en lugar de la posición 30. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 49 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 49

[0287] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 16tetrahidropiran-2-iloxipalmítico en lugar del ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (8) en el paso 2, y utilizando ácido mclorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial de 20 % B hasta una concentración intermedia de 10 % B (100 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final de 30 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 50 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 50

[0288] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 48**, e instalando la secuencia de lípido enlazador en la posición 23 en lugar de la posición 30.

Ejemplo 51 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 51

[0289] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 9, usando Fmoc-Lys(PalGluOtBu)-OH (de Péptido Activo) en lugar de Fmoc-Leu-OH en la posición 30 y Fmoc-Ser(tBu)-OH en lugar de FmocLys(Boc)-OH en la posición 4, en el paso 1. Se usó EtOH al 60 %/H₂O como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y solución acuosa saturada. Se utilizó NaHCO₃ en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (NH₄OH 10 mM en agua, pH ~ 9) y el tampón B (MeCN) que oscilaba entre una concentración inicial del 10 % de B y una concentración intermedia del 20 % de B (100 mpm) durante 5 min, y luego hasta una concentración final del 30 % de B (100 mpm) durante 40 min. Las fracciones impuras se volvieron a cromatografiar utilizando un gradiente compuesto por una concentración inicial del 10 % de B y una concentración intermedia de 20 % B (100 mpm) durante 5 min, y luego a una concentración final de 30 % B (100 mpm) durante 60 min.

Ejemplo 52 Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 52

[0290] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 43, utilizando ácido carboxílico Fmoc-dPEG12 en lugar de las unidades tándem Fmoc-OEG-OH e incorporándolo junto con Fmoc-Glu-OtBu y ácido palmítico, en el paso 2. La secuencia de lípidos del enlazador se instaló en la posición 11 en lugar de la posición 30. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el Ejemplo 19, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 53 Síntesis de Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 53

[0291] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 52, utilizando cuatro unidades de FmocOEG-OH en tándem en lugar de ácido carboxílico Fmoc-dPEG12.

Ejemplo 54 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 54

[0292] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 53**, instalando dos unidades de Fmoc-OEG-OH en tándem en lugar de dos.

Ejemplo 55 Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 55

[0293] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 43**, instalando la secuencia de lípidos del enlazador en la posición 23 en lugar de la posición 30. El péptido lineal crudo se purificó y se ciclizó de acuerdo con la modificación descrita en el Ejemplo 19, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 45 de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 56: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 56

[0294] El compuesto del título se preparó utilizando los métodos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido (4'-clorobifenil-4-il)-acético en lugar del ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (8) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y solución acuosa saturada de NaHCO₃ se utilizó en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y el tampón B (MeCN) que oscilaba entre 10 - 28 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 57: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 57

[0295] El compuesto del título se preparó utilizando los métodos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 3-[(2,4-diclorofenoxi)fen-4-il]propiónico en lugar de ácido α-tocoferiloxiacético (AcVitE) (8) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar de ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ sat'd aq. en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y el tampón B (MeCN) que oscilaba entre 10 - 30 % B (80 mpm) durante 40 min. Las fracciones que contenían producto se combinaron, se acidificaron con TFA, se concentraron y se recromatografiaron en una columna Agilent Polaris C18-A (30 × 250 mm, 100Å, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (TFA al 0,1% en agua) y tampón B (TFA al 0,1% en MeCN) desde una concentración inicial del 20 % B a una concentración intermedia del 15 % B (40 mpm) a una concentración final del 45 % B (40 mpm) durante 45 min.

Ejemplo 58: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 58

[0296] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 11-(4-fluorofenil)undecanoico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y usando ácido mclorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se usó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se usó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó usando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (NH₄OH 10 mM en agua, pH ~ 9) y el tampón B (MeCN) que oscilaba entre 15 - 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 59: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 59

[0297] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 43**, omitiendo el paso 2 e incorporando el acoplamiento de ácido palmítico en el paso 1. La secuencia de lípido-enlazador se instaló en la posición 22 en lugar de la posición 11. El péptido lineal crudo se purificó y se cicló de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 70 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 70 % B (30 mpm) durante 36 min

Ejemplo 60: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 60

[0298] El compuesto del título se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Ejemplo 53**, incorporando dos unidades FMOCPEG-OH en tándem en lugar de cuatro e instalando la secuencia de lípidos del enlazador en la posición 7 en lugar de la posición 11. El péptido lineal crudo se purificó y se cicló de acuerdo con la modificación descrita en el **Ejemplo 19**, utilizando un gradiente de 20 - 80 % B. La purificación del producto final se realizó utilizando un gradiente de 20 - 80 % B (30 mpm) durante 36 min.

Ejemplo 61: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 61

[0299] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 11-[(4-trifluorometil)fenil]undecanoico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre 15 y 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 62: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 62

[0300] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 11,11,11-trifluoroundecanoico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre 10 y 28 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 63: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 63

[0301] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 15,15,15-trifluoropentadecanoico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre el 15 y el 30 % de B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 64: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 64

[0302] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 16-etoxipalmítico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y utilizando ácido m-clorometilbenzoico en lugar del ácido m-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 x 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre 15 y 30 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 65: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 65

[0303] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo Ácido 13,13,14,14,15,15,16,16,16-D9-palmitico (Cambridge Isotopes) en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y usando ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se usó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se usó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó usando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (NH₄OH 10 mM en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que va desde 15 - 20 % B (100 mpm) durante 5 min, y luego hasta 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 66: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 66

[0304] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo el ácido 11-[(2,4-bis(trifluorometil)fenil]undecanoico en lugar del ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y utilizando ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar del ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se utilizó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se utilizó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó utilizando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (10 mM NH₄OH en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba entre 15 y 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 67: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 67

[0305] El compuesto del título se preparó siguiendo los procedimientos descritos en el **Ejemplo 11**, sustituyendo 11-[(3,5-Ácido 5 bis(trifluorometil)fenil]undecanoico en lugar de ácido α -tocoferiloxiacético (AcVitE) (**8**) en el paso 2, y usando ácido *m*-clorometilbenzoico en lugar de ácido *m*-bromometilbenzoico en el paso 4 (**Ejemplo 9**, paso 2). Se usó EtOH/H₂O al 60 % como disolvente en lugar de MeCN/H₂O y se usó NaHCO₃ acuoso saturado en lugar del tampón NH₄OAc en el paso 4 para efectuar la ciclización. La purificación del producto se realizó usando una columna Waters XBridge C18 OBD (50 × 250 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente. La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (NH₄OH 10 mM en agua, pH ~ 9) y tampón B (MeCN) que oscilaba 15 - 35 % B (100 mpm) durante 40 min.

Ejemplo 68: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 68

1. Síntesis de (Fmoc)- β A-IKPEAPGEK((Alloc)ASPEELNRYASYLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-resina Sieber

[0306] Las extensiones de aminoácidos sobre la resina Sieber (ψ-R35, Y36) precargada del **Ejemplo 1**, paso 2 (0,1 mmol) se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando DMF como disolvente, un exceso de 6 veces de aminoácidos protegidos y un protocolo HATU/DIEA (10 min, doble acoplamiento). Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc en dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; tiempo de reacción; 10 min, 15 min).

2. Síntesis de (Fmoc)- β A-IKPEAPGEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASYLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-resina Sieber

[0307] La desprotección de la resina anterior se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el **Ejemplo 1**, paso 4, utilizando tiempos de reacción de 10 min para cada tratamiento. A continuación se acopló la resina con el intermedio 2 (15) (5 eq.), utilizando un protocolo HATU/DIEA en DMF (1 h, temperatura ambiente).

3. Síntesis de (BrAc)- β A-IKPEAPGEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASYLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-Resina Sieber

[0308] Después de la desprotección de Fmoc (20 % de piperidina/DMF), la resina anterior se trató con anhídrido bromoacético (10 equivalentes; ta, 30 min) para proporcionar la resina bromoacetilada.

4. Síntesis de (BrAc)- β A-IKPEAPGEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASYLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-CONH₂

[0309] La resina anterior se trató con un cóctel de escisión que consistía en TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5) durante 1,5 h a temperatura ambiente. El péptido crudo se precipitó con éter siguiendo el procedimiento descrito en el **Ejemplo 1**, paso 7.

5. Análogo de PYY cíclico 30 SEQ ID NO: 68

[0310] El péptido crudo obtenido anteriormente se disolvió a una concentración de 10 mg/mL en 10 % MeCN/H₂O, y se añadió TEA para elevar el pH de la solución a 8-9. Después de agitar a temperatura ambiente durante ~20 min, se añadió TFA para reducir el pH a 2, y la solución se purificó directamente por HPLC preparativa en una columna Kinetics C18 Evo (30 × 100 mm, 100 Å, 5 μ m). La fase móvil consistió en una elución en gradiente del tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y el tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 20 y el 60 % de B durante 22 min. La detección por UV se

controló a 220 y 254 nm. Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el producto como un sólido similar al algodón.

Ejemplo 69: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 69

1. Síntesis de (Boc)-G-ISPEAPGEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(OAllyl)TRQ(ψ-R35Y36)-resina Sieber

[0311] Se llevaron a cabo extensiones de aminoácidos sobre la resina Sieber (ψ-R35, Y36) precargada del Ejemplo 1, paso 2 (0,1 mmol) a temperatura ambiente utilizando DMF como disolvente, un exceso de 6 veces de aminoácidos protegidos y un protocolo HATU/NAM (10 min, doble acoplamiento). Se utilizó un protocolo de desprotección de Fmoc de dos etapas durante todo el proceso (20 % de piperidina en DMF; temperatura ambiente; 10 min, 15 min).

2. Síntesis de (Boc)-G-ISPEAPGEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(NHS)TRQ(ψ-R35Y36)-Resina Sieber

[0312] La desprotección de la resina anterior se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, paso 4, utilizando tiempos de reacción modificados de 10 min para cada tratamiento. A continuación, la resina se acopló con NHS (10 eq.), utilizando un HATU/DIEA. Protocolo en DMF (1h, ta, doble acoplamiento).

3. Síntesis de (NH₂)-G-ISPEAPGEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(NHS)TRQ(ψ-R35Y36)

[0313] La resina anterior se trató con un cóctel de escisión que consistía en TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5) durante 1,5 h a temperatura ambiente. El péptido crudo se precipitó con éter siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, paso 7.

4. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 69

[0314] El péptido crudo obtenido anteriormente se disolvió a una concentración de 80 mg/mL en DMSO y se añadió TEA (25 eq.) para efectuar la lactamización. Después de agitar a temperatura ambiente durante ~ 30 min, la reacción se diluyó 10 veces con 10 % de MeCN/agua, el pH se ajustó a 2 y el péptido crudo se purificó directamente por HPLC preparativa en una columna Kinetics C18 Evo (30 × 100 mm, 100 Å, 5 µm). La fase móvil consistió en un gradiente de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y tampón B (TFA al 0,1 % en MeCN) que oscilaba entre el 10 y el 60 % de B durante 22 min. La detección UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el péptido protegido con K(Dde). El grupo protector Dde se eliminó utilizando 2 % hidrazina/DMF (10 mg de péptido/ml), 30 min a temperatura ambiente. La reacción se diluyó 10 veces con 10 % de MeCN/agua, y el pH se ajustó a 2 con TFA y la solución de péptido crudo se purificó como se indicó anteriormente para dar el producto como un sólido similar al algodón.

Ejemplo 70: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 70

[0315] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 69, sustituyendo Fmoc-E(OAllyl)-OH por 65 Fmoc-Leu-OH en la posición 30 y sustituyendo Fmoc-Val-OH por Fmoc-E(OAllyl)-OH en la posición 31. Ejemplo 71: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 71

1. Síntesis de resina TGR (Boc)-G-ISPEAPGEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLN E(OAllyl)VTRQ(N-Me-R)Y-NovaSyn

[0316] Las extensiones de aminoácidos en una resina NovaSyn TGR (0,1 mmol) se llevaron a cabo utilizando el procedimiento descrito en

Ejemplo 69, paso 1. 2. Análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 71

[0317] El compuesto del título se preparó a partir de la resina anterior de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 69, pasos 2-4. Ejemplo 72: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 72

1. Síntesis de éster de 10 N-hidroxisuccinimida de (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-43,43-dimetil-10,19,24,41-tetraoxo-3,6,12,15,42-pentaoxa-9,18,23-triazatetracontan-1-oico

[0318] A una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-43,43-dimetil-10,19,24,41-tetraoxo-3,6,12,15,42-pentaoxa-9,18,23-triazatetracontan-1-oico (Intermedio 2 (16)) (54,0 mg, 0,063 mmol), N-hidroxisuccinimida (14,6 mg, 0,127 mmol) y HATU (24,1 mg, 0,063 mmol) en 1,0 ml de DMF se añadió DIEA (0,022 ml, 0,127 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se usa directamente en el siguiente paso sin purificación adicional.

2. Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 72

[0319] A una solución de [ciclo-(G2-E30), S4, K11, ψ-(R35,Y36)]-PYY2-36 (preparada en el Ejemplo 70) (4 mg, 0,96 µmol) en DMF (0,2 mL) se añadieron 24 µL de la solución de éster N-hidroxi (preparada en el Paso 1) y TEA (0,66 µL; 5 eq) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó 10 veces con 10 % de MeCN/agua, el pH se ajustó a 2 con TFA y el péptido crudo se purificó directamente por HPLC preparativa en una columna Kinetics

C18 Evo (30 × 100 mm, 100 Å, 5 µm). La fase móvil consistió en una elución en gradiente de tampón A (0,1 % de TFA en agua) y tampón B (0,1 % de TFA en MeCN) que oscilaba entre 10 y 60 % de B durante 22 min. La detección UV se controló a 220 y 254 nm. Las fracciones puras se combinaron y luego se liofilizaron para dar el péptido protegido con éster de t-butilo. Los grupos protectores de éster de t-butilo se eliminaron utilizando una mezcla de TFA/H₂O/TIPS (95:2,5:2,5) durante 1,5 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró y el péptido se purificó como se indicó anteriormente para dar el producto como un sólido similar al algodón.

Ejemplo 73: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 73

[0320] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo ácido N-carboxílico FmocdPEG6 para ácido carboxílico N-Fmoc-dPEG12 en el paso 5.

Ejemplo 74: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 74

[0321] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 pero omitiendo el paso 5 de acoplamiento del enlazador PEG.

Ejemplo 75: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 75

[0322] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo FmocC(trt)-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31 y omitiendo el paso de acoplamiento Fmoc-βA-OH en el paso 3.

Ejemplo 76: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 76

[0323] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con el paso 3 y paso 4 modificados. En el paso A, se utilizaron Fmoc-K(Alloc)-OH y Fmoc-K(dde)-OH para la posición 30 y la posición 11, respectivamente. Después de desproteger Alloc en la posición 30 con Pd(PPh₃)₄-fenilsilano, se acopló el ácido mPEG16-carboxílico con HATU-DIPEA. En el paso 4, se eliminó el dde en la posición 11 con 2 % de hidrazina en DMF.

Ejemplo 77: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 77

[0324] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 76 sustituyendo mPEG12-ácido carboxílico por mPEG16-ácido carboxílico en el paso A, y omitiendo el paso de acoplamiento Fmoc-dPEG12-ácido carboxílico en el paso 5.

Ejemplo 78: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 78

[0325] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-NMe-Q(trt)-OH para Fmoc-Q(trt)-OH en el paso 3.

Ejemplo 79: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 79

[0326] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-NMe-R(pbf)-OH para Fmoc-R(pbf)-OH en el paso 1B.

Ejemplo 80: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 80

[0327] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 79 sustituyendo FmocR(pbf)-OH por Fmoc-K(Boc)-OH en la posición 4, y sustituyendo Fmoc-W(Boc)-OH por Fmoc-L-OH en la posición 30 en el paso 3.

Ejemplo 81: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 81

[0328] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 80 sustituyendo Fmoc-60 60 C(trt)-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, y sustituyendo Fmoc-ácido γ-aminobutanoico por Fmoc-βA-OH en el paso 3.

Ejemplo 82: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 82

[0329] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo el ácido carboxílico Fmoc-PEG2 por Fmoc-βA-OH y Fmoc-C(trt)-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, así como omitiendo el acoplamiento 65 de Fmoc-Ile-OH en el paso 3.

Ejemplo 83: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 83

[0330] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo FmocK(N3)-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, sustituyendo ácido pent-4-inoico por Fmoc-βA-OH en el paso 3 y siguiendo el procedimiento de ciclización B como se indica a continuación.

[0331] Procedimiento de ciclización B: A una solución de péptido completamente desprotegido con PEG12-AcBr instalado en la posición 11 (38 mg, 0,0067 mmol) en 2 mL de HEPES (pH 7,4) se añadieron 1,7 mL de la solución premezclada de CuSO₄/TBTA (la solución se preparó mezclando una solución de 2,2 mg de CuSO₄ en agua (0,4 mL) con una solución de 11 mg de TBTA en EtOH), seguido de la adición de 7 mg de ascorbato de sodio en agua (1 mL). La solución de reacción transparente se dejó mezclando a temperatura ambiente y se controló mediante HPLC. Después de 30 min, la reacción se completó y la mezcla de reacción se ajustó a pH 4 usando TFA y se sometió a purificación por HPLC (columna Pursuit XRS 5 250x30 mm C18, funcionando a un flujo de 30 mpm, monitoreando una longitud de onda de 214 nM, con un gradiente que va desde 20-60 % ACN-agua/agua ambos con 0,1 % TFA durante 36 minutos). La fracción deseada se recolectó y se liofilizó.

Ejemplo 84: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 84

[0332] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 omitiendo el paso de acoplamiento de Fmoc-βAOH, sustituyendo el ácido N3-PEG8-carboxílico por el ácido Fmoc-dPEG₁₂-carboxílico en el paso 5, y sustituyendo el acoplamiento de ácido 3-(bromometil)benzoico con DIC por la acilación de anhídrido bromoacético en el paso 3, y siguiendo el procedimiento de ciclización C como se indica a continuación.

[0333] Procedimiento de ciclización C: A una solución de péptido completamente desprotegido (20 mg, 0,0035 mmol) en 5 mL de agua desgasificada, se añadió una solución acuosa de NaHCO₃ para ajustar la mezcla de reacción a un pH de 6,4 o superior. Después de 20 min, el LCMS indicó que la reacción se había completado y la mezcla de reacción se ajustó a un pH de 4 utilizando TFA y se sometió a purificación por HPLC (columna Pursuit XRS 5 250x30 mm C₁₈, funcionando a un flujo de 30 mpm, controlando una longitud de onda de 214 nM, con un gradiente que oscilaba entre 10-60 % de ACN-agua/agua, ambos con 0,1 % de TFA durante 36 minutos). La fracción deseada se recogió y se liofilizó.

[0334] Después de la ciclización, el intermedio ciclizado se sometió a una extensión de enlace mediante química de clic siguiendo el procedimiento de ciclización B con N-(1-bromo-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-il)pent-4-inamida, que se preparó mediante el acoplamiento de N-Boc-PEG4-NH₂ con ácido pent-4-inoico utilizando HATU-DIPEA, seguido de la desprotección de Boc con TFA y la acilación con anhídrido bromoacético en presencia de TEA.

Ejemplo 85: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 85

[0335] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con el enlazador PEG12-AcBr instalado en la posición 23 en lugar de la posición 11.

Ejemplo 86: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 86

[0336] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con el enlazador PEG12-AcBr instalado en la posición 22 en lugar de la posición 11.

Ejemplo 87: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 87

[0337] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con el enlazador PEG12-AcBr instalado en la posición 7 en lugar de la posición 11.

Ejemplo 88: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 88

[0338] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-V-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, sustituyendo Fmoc-C(trt)-OH por Fmoc-L-OH en la posición 30 y sustituyendo Fmoc-GOH por Fmoc-βA-OH en el paso 3.

Ejemplo 89: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 89

[0339] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 88 omitiendo el paso 1 para preparar el dipéptido reducido y sustituyendo la carga de Fmoc-Y(tBu)-OH seguido del acoplamiento con Fmoc-(N-Me)R-OH por la carga de Fmoc-psi-(R35-N(Boc)-Y36)-OH en el paso 2.

Ejemplo 90: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 90

[0340] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 89 sustituyendo Fmoc-βAOH por Fmoc-G-OH en el paso 3.

Ejemplo 91: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 91

[0341] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 89 sustituyendo Fmoc-hC(trt)-OH por Fmoc-C(trt)-OH en la posición 30 en el paso 3.

Ejemplo 92: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 92

[0342] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 90 sustituyendo Fmoc-hC(trt)-OH por Fmoc-V-OH en la posición 31, y sustituyendo Fmoc-L-OH por Fmoc-C(trt)-OH en la posición 30 en el paso 3.

Ejemplo 93: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 93

[0343] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-V-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, sustituyendo Fmoc-C(trt)-OH por Fmoc-L-OH en la posición 30 y sustituyendo Fmoc-GOH por Fmoc-βA-OH en el extremo N en el paso 3.

Ejemplo 94: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 94

[0344] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-V-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31 y sustituyendo Fmoc-C(trt)-OH por Fmoc-L-OH en la posición 30 en el paso 3.

Ejemplo 95: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 95

[0345] El compuesto del título se preparó (escala de 0,05 mmol) de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-V-OH por Fmoc-hC(trt)-OH en la posición 31, sustituyendo Fmoc-Glu(OAlloc)-OH por Fmoc-L-OH en la posición 30, sustituyendo Fmoc-Lys(dde)-OH por Fmoc-Lys(Alloc)-OH en la posición 11, sustituyendo Fmoc-Ser(tBu)-OH por Fmoc-K(Boc)-OH en la posición 4 y sustituyendo Boc-G-OH por Fmoc-βA-OH en el extremo N en el paso 3.

[0346] A la resina resultante de lo anterior se le añadió DCM desoxigenado (10 mL), fenilsilano (10 eq.) y una solución de Pd(PPh₃)₄ (0,2 eq.) en DCM (1 mL) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. La reacción se drenó y la resina se lavó con DCM desoxigenado y la desprotección se repitió una vez.

[0347] A la resina resultante de lo anterior se le añadió DMF (10 ml), HATU (5 eq) y DIEA (10 eq) y la mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se añadió una solución de N-hidroxisuccinimida (10 eq) en DMF y se agitó durante 20 minutos adicionales. La resina se filtró y el procedimiento se repitió una vez.

[0348] La resina anterior se desprotegió durante 2 horas a temperatura ambiente en TFA/TIPS/agua (95/2,5/2,5) (10 ml). El cóctel de escisión se concentró a aproximadamente 1 ml y luego se añadió a 40 ml de éter. El precipitado resultante se recogió por centrifugación y se secó bajo N₂.

[0349] El material resultante de lo anterior se disolvió en 9 ml de DMSO al que se añadieron 10 eq de TEA y se dejó que la reacción transcurriera durante 3 horas a temperatura ambiente. La solución resultante se diluyó a 30 ml con agua, el pH se ajustó a 2 y se purificó por RP-HPLC en una columna C18 de 30 mm × 250 mm eluyendo con un gradiente lineal de 20-40 % de ACN en agua (0,1 % de TFA) en 30 minutos. Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron.

[0350] El material resultante de lo anterior se trató luego con 1-2 % de hidrazina/DMF (1 mL) para eliminar el Dde de la lisina. La mezcla resultante se diluyó a 10 ml con agua, el pH se ajustó a 2 y luego se purificó por RP-HPLC como se indicó anteriormente.

[0351] El producto resultante se disolvió luego en 10 % de ACN/agua, el pH se ajustó a 10, y se añadió una solución de éster de N-hidroxisuccinimida bromoacético (3 eq de solución de 0,1 M/DMF) y se dejó que la reacción continuara durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó a 10 ml con agua, el pH se ajustó a 2 y luego se purificó por RP-HPLC como se indicó anteriormente para dar el producto del título.

Ejemplo 96: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 96

[0352] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo el ácido carboxílico NFmocdPEG₂₄ por el ácido carboxílico N-Fmoc-dPEG₁₂ en el paso 5.

Ejemplo 97: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 97

[0353] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sustituyendo Fmoc-GOH por Fmoc-βA-OH en el paso 3.

Ejemplo 98: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 98

[0354] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 89 pero omitiendo el Paso de acoplamiento de ácido carboxílico-FmocdPEG₁₂ en el paso 5.

Ejemplo 99: Síntesis del análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 99

[0355] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 90 pero omitiendo el Paso de acoplamiento de ácido carboxílico-FmocdPEG₁₂ en el paso 5.

Ejemplo 100: Síntesis de análogo de PYY cíclico SEQ ID NO: 100

[0356] El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 94 pero omitiendo el paso de acoplamiento de ácido carboxílico-FmocdPEG₁₂ en el paso 5.

Ejemplo 101: Identificación y producción de mAb MSCB97**Selección de PH9L3 VL y PH9H5 VH como regiones V iniciales para ingeniería**

[0357] La región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) denominada PH9L3 (SEQ ID NO:128) (Teplyakov et al., "Structural diversity in a human antibody germinal line library", mAbs Aug-Sep 8(6):1045-63 (2016)) y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH) denominada PH9H5 (SEQ ID NO:129) (Teplyakov et al., "Structural diversity in a human antibody germinal line library", mAbs Aug-Sep 8(6):1045-63 (2016)) se seleccionaron como las regiones variables iniciales a partir de las cuales diseñar un mAb habilitado para la conjugación de péptidos. PH9L3 está compuesto completamente de secuencias del gen V de la línea germinal de Ig humana y, como tal, no contiene ninguna mutación de secuencia del proceso de maduración de afinidad *in vivo* que daría como resultado una unión específica de antígeno de alta afinidad. El CDR3 de PH9H5 es el único segmento que no está compuesto por secuencias del gen V de la línea germinal humana en ese VH. El CDR3 de PH9H5 proviene de un anticuerpo anti-CCL2 humano, CNTO 888 y se proporciona mediante SEQ ID NO: 130. Se generó un Fab que contiene el par VH/VL PH9H5/PH9L3.

[0358] Las secuencias de la región V y la región J de la línea germinal de Ig humana PH9L3, PH9H5 y con las que son más similares se alinearon para determinar la identidad de secuencia o similitud con las secuencias de la línea germinal. PH9H5 se alineó con una concatenación (SEQ ID NO: 131) de los genes de la línea germinal de Ig humana IGHV3-23*01 (PubMed ID: M99660) (SEQ ID NO: 132) e IGHJ1*01 humana (PubMedID: J00256) (SEQ ID NO: 133), siendo la única diferencia entre la secuencia de aminoácidos de PH9H5 y la secuencia IGHV3-23*01-IGHJ1*01 humana concatenada en VH CDR3, que era SEQ ID NO: 130 para PH9H5.

[0359] PH9L3 se alineó con una concatenación (SEQ ID NO: 134) de genes de línea germinal de Ig humana IGKV3-11*01 (PubMed ID: X01668) (SEQ ID NO: 135) e IGKJ1*01 (PubMed ID: J00242) (SEQ ID NO: 136), con la única diferencia de una desviación en la unión del gen V/gen J.

Diseño y generación de variantes sustituidas con Cys de PH9H5 y PH9L3

[0360] Se diseñaron, generaron y clonaron variantes de la VH de PH9H5 que contienen una única sustitución de Cys en residuos CDR seleccionados en los tres CDR de la región V como cadenas pesadas completas con una región constante de IgG1 humana en un vector de expresión huésped mamífero. La estructura Fab de PH9H5/PH9L3 se utilizó para ayudar en la selección de residuos de CDR para la sustitución que parecen más accesibles para la conjugación y en algunas de las variantes, se insertaron residuos de glicina (Gly) adicionales a cada lado del residuo de Cys introducido para aumentar potencialmente la accesibilidad de Cys para la conjugación. Se diseñaron y generaron variantes similares de PH9L3 VL, excepto que se clonaron como cadenas ligeras completas con una región constante kappa humana en el vector de expresión. Se generó un total de 24 construcciones de expresión de variantes de Cys simples de PH9H5 y 22 construcciones de expresión de variantes de Cys simples de PH9L3. Los residuos seleccionados para la sustitución dentro de PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129) y dentro de PH9L3_VL (SEQ ID NO: 128) se resumen en la Figura 2.

[0361] Los constructos de expresión generados se utilizaron para expresar las variantes de Cys mediante la cotransfección transitoria de cada constructo de la variante Cys de HC basado en PH9H5 con el constructo de LC de tipo salvaje PH9L3 o la cotransfección de cada constructo de la variante Cys de LC basado en PH9L3 con el constructo de HC de tipo salvaje PH9H5. Las transfecciones de prueba iniciales utilizaron Expi293 derivado de HEK como huésped de expresión y se realizaron a escala de 20 ml. La mayoría de las variantes Cys de HC y LC se expresaron bien en función de la cuantificación de la proteína variante a partir del sobrenadante de cultivo.

[0362] Se expresaron cinco variantes iniciales de HC Cys, MSCB33-MSCB37, en Expi293 a escala de 750 ml y se purificaron las proteínas variantes. El rendimiento de purificación y las propiedades de calidad de las variantes purificadas fueron bastante similares y suficientes para utilizar las proteínas purificadas en reacciones iniciales de conjugación de péptidos.

Evaluación de la conjugación de péptidos con variantes de HC Cys basadas en PH9H5

[0363] La determinación analítica de la masa de la proteína MSCB33 y otras proteínas variantes indicó la presencia de aductos de cisteína en la Cys diseñada para la conjugación, con dos por mAb, así como la eliminación del residuo de Lys C-terminal de HC, que se observa comúnmente en mAb producidos de forma recombinante. Para preparar los mAb variantes para la conjugación, los aductos se eliminaron mediante un proceso de reducción desarrollado para mantener los enlaces disulfuro nativos dentro del mAb (véase el Ejemplo 103). Se realizaron conjugaciones de prueba iniciales con un análogo peptídico de oxintomodulina humana (OXM) (GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30- ϵ -(PEG12)-NH₂) utilizando química de maleimida en los cinco mAb variantes de Cys HC. La eficiencia de la conjugación difirió entre las variantes de mAb, lo que se estimó cualitativamente mediante los productos de la reacción de conjugación y el porcentaje relativo de cada uno. La mayor eficiencia, medida por el mayor porcentaje de producto homodímero, se observó con MSCB33, en comparación con las otras variantes I102C que contenían residuos Gly flanqueantes, y se observó poca o ninguna conjugación con las variantes Y103C MSCB35 o MSCB37.

[0364] Varias otras variantes de Cys de HC y LC, con sustituciones de cisteína diseñadas en varias CDR (una sustitución T28C, S30C y S54C en PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129), y una sustitución S30C y S92C en PHpL3_VL (SEQ ID NO: 128)) se expresaron a gran escala en Expi293. La eliminación de los aductos de Cys de estas proteínas purificadas por reducción fue un desafío y estas variantes no se investigaron más. Debido a los desafíos observados con la mayoría de las variantes de Cys y la buena eficiencia de conjugación inicial observada con el mAb de la variante I102C PH9H5, MSCB33, el desarrollo del proceso y los esfuerzos de ingeniería adicionales se centraron en esta variante en particular.

Ingeniería de Fc de MSCB33

[0365] MSCB33 fue rediseñado para contener el Fc IgG4_PAA humano silencioso para reducir la función Fc *in vivo*. El IgG4_PAA humano tiene mutaciones S228P/F234A/L235A en el alotipo nG4m(a) de IgG4 humano (basado en el aleloIGHG4*01 como se define en IMGT). Se generó un constructo de expresión con el VH de MSCB33 fusionado al Fc IgG4_PAA y se utilizó junto con el mismo constructo de expresión LC utilizado para la expresión de MSCB33 para producir la variante IgG4_PAA de MSCB33, que se designa MSCB97. Las secuencias de aminoácidos de VH, HC, VL y LC de MSCB97 se proporcionan mediante SEQ ID NO: 137, 138, 139 y 140, respectivamente.

[0366] La expresión de prueba de MSCB97 se realizó de manera transitoria a una escala de 20 ml en células Expi293 y esta variante de mAb se expresó bien. MSCB97 se purificó a partir de una serie de expresión de Expi293 a gran escala. El rendimiento de purificación de MSCB97 fue de 264,53 mg/L y la calidad se determinó en un 85 % de especies monoméricas. Las series de expresión y purificaciones a gran escala posteriores fueron similares o mejores en rendimiento y calidad e indicaron la consistencia con la que se podía producir este mAb.

Evaluación de la conjugación de péptidos con MSCB97 y escalabilidad de la reacción de conjugación

[0367] La conectividad del disulfuro LC-HC difiere entre los isotipos IgG1 e IgG4, por lo que se probó la reducción y la conjugación con maleimida y se confirmó que era traducible del mAb MSCB33 de IgG1 al mAb MSCB97 de IgG4_PAA utilizando la reducción con TCEP y la conjugación del péptido de prueba OXM-maleimida descrito anteriormente. Se sabe que el enlace resultante de la conjugación con maleimida es potencialmente reversible, por lo que se adoptó e implementó con éxito la química de conjugación con bromoacetamida, que produce un enlace más estable, en una escala de 10 mg basada en MSCB97 de partida.

[0368] El conjugado MSCB97 del análogo de OXM GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30- ϵ -(PEG12)-NH₂ (MSCB97-OXM1) generado a través de la química de bromoacetamida se analizó para determinar las potencias *in vitro* de GLP-1R y GCGR. Las potencias relativas a los péptidos de referencia y a los conjugados de polipéptidos no estructurados de referencia fueron razonables y similares a las del conjugado generado con el mismo péptido para MSCB33 (IgG1). Esto demostró que la única diferencia entre MSCB97 (IgG4_PAA) y MSCB33 (IgG1), que es el isotipo, no tuvo impacto en la potencia de los conjugados que contienen el mismo péptido. Además, estos datos demostraron que las potencias *in vitro* deseables podrían conservarse en un conjugado péptido-mAb generado con química de bromoacetamida que produce un enlace que es estable *in vivo*. También se conjugaron otros análogos de OXM con MSCB97 y se analizaron las potencias *in vitro* de estos conjugados. Estos conjugados tenían potencias de GLP-1R y GCGR similares a MSCB97-OXM1, lo que destaca la capacidad de conjugar una variedad de péptidos con MSCB97, manteniendo al mismo tiempo la potencia del péptido.

Evaluación de la unión del conjugado péptido-MSCB97 a CCL2 humano

[0369] Si bien MSCB97 fue seleccionado y diseñado por falta de unión a antígenos específicos, el antígeno más probable al que este mAb podría unirse, si lo hubiera, es CCL2 humano en función del origen del CDR3 de VH. Se evaluó si MSCB97 demuestra alguna unión específica a CCL2 utilizando dos conjugados péptido-MSCB97, con un análogo de péptido OXM o un análogo de péptido PYY.

[0370] La unión potencial de CCL2 se midió directamente mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en la que los conjugados se inmovilizaron en la superficie utilizando un método de captura anti-Fc. Un mAb de ratón anti-CCL2 disponible comercialmente sirvió como control positivo y dos anticuerpos humanos no específicos, CNTO 9412 y HH3B33, sirvieron como controles negativos. Todos los controles se inmovilizaron en la superficie de manera similar y se hizo fluir CCL2 humano recombinante sobre conjugados inmovilizados y controles a concentraciones de hasta 400 nM. Con base en los criterios de ensayo preestablecidos, se observó acumulación de CCL2, lo que indica unión a antígeno específica, con el control positivo, pero no con los controles negativos ni con ninguno de los conjugados péptido-MSCB97. Esto confirmó que MSCB97, en la forma terapéutica relevante de un conjugado péptido-mAb, carece de unión a CCL2 humana.

Ejemplo 102: Expresión y purificación del mAb

[0371] El anticuerpo monoclonal completamente humano (mAb) se puede expresar de forma recombinante en un huésped de expresión mamífero y purificarse a partir del sobrenadante del cultivo celular utilizando métodos estándar que se conocen en el campo. Por ejemplo, una secuencia de ADNc que codifica las cadenas ligeras (LC) y pesadas (HC) del mAb, cada una incluyendo un péptido señal apropiado para permitir la secreción, se puede clonar en vectores de expresión mamíferos separados o en un único vector de expresión utilizando métodos estándar de biología molecular. Los vectores de expresión utilizados pueden ser cualquiera de los disponibles comercialmente, tales como pEE12.4, pcDNA™3.1(+) o pIRESpuo3 o cualquier vector de expresión personalizado con funcionalidades similares. En dichos vectores, la transcripción de las cadenas pesadas y ligeras del mAb está impulsada por cualquiera de los promotores eficaces conocidos, tales como el promotor hCMV-MIE. El ADN plasmídico de grado de transfección se prepara para construcciones de expresión de LC y HC separadas o una única construcción que expresa tanto LC como HC utilizando métodos estándar, tales como un kit QIAGEN Plasmid Midi.

[0372] El ADN plasmídico purificado se prepara para la transfección con un reactivo de transfección basado en lípidos, como el reactivo de transfección Freestyle™ Max, siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego se transfecta en una línea celular huésped de expresión de mamíferos estándar, como CHO-S o HEK 293-F. Si los mAb LC y HC están codificados por construcciones de expresión separadas, las dos construcciones se transfectan simultáneamente. Antes y después de la transfección, las células de mamíferos se cultivan para el mantenimiento o para la expresión de mAb siguiendo métodos de cultivo celular estándar por los cuales los rangos de densidad celular a mantener, los medios de cultivo a utilizar y las otras condiciones de cultivo celular seguidas se determinan por la línea celular huésped de mamíferos específica utilizada. Estos parámetros están típicamente documentados por el proveedor del cual se obtuvo la línea celular o en la literatura científica. Por ejemplo, las células CHO-S se mantienen en medio CHO Freestyle™ en suspensión, agitando a 125 RPM en una incubadora humidificada a 37 °C y 8 % de CO₂, y se dividen cuando la concentración de células está entre 1,5 y 2,0 × 10⁶ células por ml.

[0373] Los sobrenadantes de cultivo celular de las células de mamífero transfectadas transitoriamente que expresan el mAb se recolectan varios días después de la transfección, se clarifican por centrifugación y se filtran. La duración de la expresión para las células CHO-S es típicamente de cuatro días, pero se puede ajustar y puede diferir para diferentes líneas de células huésped de mamíferos. Las transfecciones a gran escala (>10 litros) se concentran 10 veces utilizando un concentrador como Centramate. El mAb se purifica a partir del sobrenadante clarificado utilizando una columna de afinidad de proteína A como HiTrap MabSelect Sure utilizando métodos estándar para unir el mAb a la resina de proteína A, lavando la resina y eluyendo la proteína utilizando un tampón de pH bajo. Las fracciones de proteína se neutralizan inmediatamente por elución en tubos que contienen un tampón de pH 7 y las fracciones pico se agrupan, se filtran y se dializan contra solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2 durante la noche a 4 °C. Después de la diálisis, el mAb se filtra nuevamente (filtro de 0,2 µ) y la concentración de proteína se determina por absorbancia a 280 nm. La calidad de la proteína mAb purificada se evalúa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE) y HPLC de exclusión por tamaño analítico y los niveles de endotoxina se miden utilizando un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL). El mAb purificado se almacena a 4 °C.

Expresión y purificación de MSCB97 a partir de células CHO transfectadas transitoriamente

[0374] MSCB97 se expresó en células ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA; Cat # A29127) mediante transfección transitoria de las células con ADN plasmídico purificado de un constructo de expresión MSCB97 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células ExpiCHO-S™ se mantuvieron en suspensión en medio de expresión ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, Cat # A29100) en una incubadora con agitación ajustada a 37 °C, 8 % de CO₂ y 125 RPM. Las células se pasaron de manera que el día de la transfección se pudiera lograr una dilución de hasta 6,0 × 10⁶ células por ml, manteniendo la viabilidad celular al 98 % o mejor. Las transfecciones transitorias se realizaron utilizando el kit de transfección de CHO ExpiFectamine™ (ThermoFisher Scientific Cat # A29131). Por cada ml de células diluidas que se van a transfectar, se utiliza un microgramo de ADN plasmídico y se diluye en medio de formación de complejos OptiPRO™ SFM. El reactivo CHO ExpiFectamine™ se utiliza en una proporción de 1:3 (v/v, ADN:reactivo) y también se diluye en OptiPRO™. El ADN diluido y el reactivo de transfección se combinaron durante un minuto, lo que permitió la formación del complejo ADN/lípido, y luego se agregaron a las células. Después de la incubación durante la noche, se agregó el alimento ExpiCHO™ y el potenciador CHO ExpiFectamine™ a las células. Las células se cultivaron con agitación a 32 °C durante cinco días antes de recolectar los sobrenadantes de cultivo.

[0375] Los sobrenadantes de cultivo de las células ExpiCHO-S™ transfectadas transitoriamente se recolectaron mediante clarificación mediante centrifugación (30 min, 6000 rpm) seguida de filtración (membrana PES de 0,2 µ, Corning). Las transfecciones a gran escala (de 5 a 20 litros) se concentraron primero 10 veces utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial Pall Centramate. Se añadió 10x DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco), pH 7,2 al sobrenadante hasta una concentración final de 1x antes de cargarlo en una columna HiTrap MabSelect Sure Protein A equilibrada (DPBS, pH 7,2) (GE Healthcare; Little Chalfont, Reino Unido) a una concentración relativa de ~20 mg de proteína por ml de resina, utilizando un sistema de cromatografía FPLC AKTA. Después de la carga, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de DPBS, pH 7,2. La proteína se eluyó con 10 volúmenes de columna de 0,1 M Na-Acetato, pH 3,5. Las fracciones de proteína se neutralizaron inmediatamente mediante elución en tubos que contenían 2,0 M Tris, pH 7 al 20 % del volumen de la fracción de elución. Las fracciones pico se agruparon y el pH se ajustó a ~5,5 con Tris adicional, si fue necesario. La proteína purificada se filtró (0,2 µ) y la concentración se determinó por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro BioTek SynergyHT™. La calidad de la proteína purificada se evaluó mediante SDS-PAGE y HPLC de exclusión por tamaño analítico (sistema HPLC Dionex). El nivel de endotoxina se midió utilizando un ensayo turbidométrico LAL (PyroTrell®-T, Associates of Cape Cod).

Ejemplo 103: Conjugación de mAb y análogo de PYY cíclico

Método A: Reducción parcial de mAb con TCEP

[0376] Una solución de 10 mg/mL de mAb en tampón tris-acetato (20 mL, 1 mM en EDTA) se trató con 3 equivalentes de TCEP. La solución se ajustó a pH 6 y después de 1 hora a temperatura ambiente, la cromatografía líquida de alta presión con espectrómetro de masas (LCMS) mostró que los aductos de disulfuro en la posición C102 se habían reducido completamente. El mAb reducido se purificó por adsorción y elución de proteína A (4 CV 100 mM de ácido acético) para proporcionar 180 mg de mAb reducido.

Conjugación de mAb reducido y análogo de PYY cíclico

[0377] Se añadió péptido liofilizado (5 eq vs mAb) al mAb reducido descrito anteriormente. Se añadió EDTA a una concentración final de 1 mM y se ajustó el pH a 7. La concentración se ajustó a 8 mg/mL y se dejó que la reacción continuara con agitación suave durante 16 h a temperatura ambiente. Se añadió TCEP (0,5 eq vs mAb) y se dejó que la reacción continuara durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave, después de lo cual las especies de alto peso molecular (PM) se redujeron a menos del 3 %.

[0378] La mezcla de reacción se ajustó a pH 5,5 y se purificó por cromatografía de intercambio iónico en resina CaptoSP utilizando un gradiente de 100 % A (100 mM de acetato de TRIS, pH 5,5) a 100 % B (100 mM de acetato de TRIS, pH 5,5; 0,5 M NaCl) sobre 20 CV. Las fracciones que contenían el conjugado deseado se agruparon y se recuperaron 140 mg de conjugado, coeluyendo con una pequeña cantidad de péptido sin reaccionar. La purificación final se realizó por adsorción y elución de proteína A (4 CV, ácido acético 100 mM). El pH del producto se ajustó a 6 para dar 120 mg de conjugado (rendimiento del 60 %) con una pureza >90 % con especies de alto peso molecular <3 %.

Método B Purificación de mAb por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

[0379] Se cargó una solución de 20 mg/mL de mAb en tampón de tris-acetato en una columna de interacción hidrofóbica (TOSOH TSKgel fenil 7,5 x 21 cm) y se eluyó con un gradiente lineal (0-70 % B/A, disolvente A: 5 % iPrOH, 1 M (NH₄)₂SO₄, tampón de fosfato 100 mM, pH 6,0; disolvente B: 20 % iPrOH, tampón de fosfato 100 mM). Los picos de monómero de mAb se agruparon, se concentraron (5-10 mg/mL) y se dializaron frente a tampón de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) (100 mM, pH 5,5).

Reducción parcial con TCEP y conjugación de mAb reducido con análogo de PYY cíclico

[0380] Al mAb purificado (27 mL, 9,28 mg/mL) se le añadieron 4 eq. de TCEP seguido de EDTA (1 mM). Después de 2 h a temperatura ambiente, el análisis por LCMS mostró que los aductos de disulfuro en la posición C102 se habían reducido por completo. El mAb reducido se trató con una columna de centrifugación de desalinización Zebra (7x10 mL, 7K MWCO, preequilibrio con MOPS 100 mM pH 5,5) para eliminar las cisteínas/GSH liberadas. A las fracciones combinadas del mAb reducido (28 mL) se le añadió una solución de PYYpeptide en agua de grado Milli Q (6,5 eq frente al mAb, 15-20 mg/mL) seguido de EDTA (1 mM). El pH de la reacción se ajustó a 7,2 a 7,4 mediante la adición gota a gota de NaOH 1 N. La reacción se dejó proceder durante 18 h a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción continuó durante otras 12 h después de la adición de 0,5 equiv más de TCEP para reducir el dímero mAb-mAb formado durante el curso de la reacción y permitir la conversión al homodímero mAb deseado. El pH de la reacción se redujo a pH 5,5 mediante la adición de ácido acético 2 M y el conjugado crudo se purificó por cromatografía de interacción hidrofóbica y se eluyó con un gradiente lineal (0-100 % B/A, disolvente A: 5 % iPrOH, 1M (NH₄)₂SO₄, 100mM tampón de fosfato, pH 6,0; disolvente B:

20 % iPrOH, 100mM tampón de fosfato). La purificación final se realizó por adsorción de proteína A (PBS) y elución (NaOAc, pH 3,5). El pH del producto se ajustó a 6 y se dializó contra PBS para dar la muestra final (56 %).

[0381] Alternativamente, el mAb se redujo con GSH y/o Cys. Después de la eliminación del agente reductor mediante filtración de flujo tangencial (TFF), se añadió un exceso del péptido al mAb reducido opcionalmente en presencia de 0,2-0,5 equivalentes de TCEP.

5 Ejemplo 104: Caracterización del conjugado de mAb

[0382] La caracterización analítica de los conjugados PYY-mAb se realizó utilizando (i) cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), (ii) medición de masa intacta mediante LC-ESIMS, (iii) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los resultados de la caracterización analítica de los conjugados PYY-mAb y el método de conjugación se muestran en la

10 Tabla 1.

Tabla 1: Datos analíticos para los conjugados PYY-mAb.

15	N-º Comp.	Conjugación	MS (Calc.) Da	MS (Encontrado) Da	Pureza SEC %	Pureza HIC %
	1	Método B	156144	156142	97.89	100
	2	Método B	155616	155617	NA	100
	3	Método B	154945	154947	NA	100
20	4	Método B	155972	155966	NA	100
	5	Método B	157668	157670	NA	100
	6	Método B	156116	156118	NA	100
	7	Método B	156172	156155	NA	100
25	8	Método B	156173	156154	NA	100
	9	Método B	156347	156350	NA	98
	10	Método B	156347	156349	NA	100
	11	Método B	156039	156040	NA	100
30	12	Método B	156450	156448	NA	100
	13	Método B	156138	156162	NA	100
	14	Método B	156201	156202	NA	100
35	15	Método B	156233	156145	93.79	97
	16	Método B	156233	156236	NA	100
	17	Método B	156060	156062	98.64	100
	18	Método A	156116	156104	98.64	ND
40	19	Método A	156144	156129	98.15	ND
	20	Método A	156144	156130	98.21	ND
	21	Método A	156200	156187	98.22	ND
	22	Método B	156082	156082	100	96
45	23	Método B	156082	156083	93	100
	24	Método B	154714	154722	86	81
	25	Método B	157202	157196	97.55	100
	26	Método B	156117	156111	99.00	10

50

Ejemplo 105: Ensayos in vitro

[0383] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para activar los receptores NPY in vitro en células clonales (HEK o CHO) que expresan receptores Y2 humanos, de rata, de ratón y de mono rhesus, y receptores Y1, Y4 e Y5 humanos. PYY3-36, NPY y PP se incluyeron en estos ensayos como controles de estudio.

55

Líneas celulares

[0384] Se desarrollaron líneas celulares clonales transfectadas estables que expresan receptores NPY para su uso en ensayos de AMPc. En resumen, las líneas celulares HEK293 se transfectaron utilizando el kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con su protocolo con plásmidos de expresión que portaban las secuencias codificantes para el receptor Y2 humano (N.º de acceso: NM_000910.2), el receptor Y5 humano (N.º de acceso: NM_000910.2),...2 humano (N.º de acceso: NM_000910.2), el receptor Y2 humano (N.º de acceso: receptor NM_000910.2 (N.º de acceso: NM_006174.2), el receptor Y2 de ratón (N.º de acceso: NM_008731) y el receptor Y2 de mono de Hesus (N.º de acceso: NM_001032832). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se volvieron a sembrar con medio de

65

selección (DMEM con alto contenido de glucosa y suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 50 UI de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 600 µg/ml de G418). Las células se mantuvieron en medio de selección durante 2 semanas antes de seleccionar clones individuales utilizando el método de dilución limitada. Las células transfectadas se mantuvieron posteriormente mediante cultivo en medio de glucosa con alto contenido de DMEM (Cellgro) suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 1 % de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio, 1 % de penicilina/estreptomycin y 600 µg/ml de G418.

[0385] Además, se obtuvieron líneas celulares CHO-K1 de DiscoverX Corporation, que expresan el receptor Y1 humano. (Número de catálogo: 93-0397C2) y el receptor Y4 humano (Número de catálogo: 95-0087C2). Las células DiscoverX cultivadas en medios F12 (Gibco) suplementados con 10 % FBS y bajo la selección G418 (800 µg/mL). El receptor Y2 de rata se expresó en una línea Glo-Sensor CHO-K1 obtenida de Promega Corporation. Estas células se transfectaron con el plásmido pGloSensor™-23F cAMP para un ensayo de cAMP basado en luminiscencia, pero se habían probado y validado para su uso con el ensayo de cAMP Perkin-Elmer LANCE. Las células Y2 de rata se cultivaron en medio F12 (Gibco) suplementado con 10 % FBS y 800 µg/ml G418.

[0386] Todas las líneas celulares se almacenaron en frascos (4×10^6 células/frasco) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El día antes del ensayo, los frascos se descongelaron y se añadieron a 15 ml de medio apropiado. Las células se centrifugaron a $450 \times g$ durante 5 min, se aspiraron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en medio sin G418 a una densidad de $0,2 \times 10^6$ células/ml. Las células se dispensaron (25 µl/pocillo) en placas de 384 pocillos recubiertas de colágeno Biocoat blancas hasta una densidad final de 5000 células/pocillo. Las placas de 30 células se incubaron durante la noche en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂/90 % de O₂. Protocolo experimental

[0387] El ensayo de AMPc fue el mismo para los diversos ensayos de receptores. El kit LANCE cAMP (Perkin Elmer Corporation; Waltham, MA) se utilizó en todos los experimentos para cuantificar los niveles intracelulares de AMPc. El día del ensayo, el medio celular se decantó de las células y se añadieron 6 µl de péptidos (concentración 2X) a los pocillos. Los péptidos se prepararon como una respuesta a la dosis de 11 puntos (comenzando con 100 nM o 10 µM con diluciones seriadas 1:3) en un tampón de estimulación. El tampón de estimulación consta de 5 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), 500 µM de IBMX y 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA) en HBSS (solución salina equilibrada de Hank). A continuación, se añadieron a las células 6 µl de tampón de estimulación que contenía forskolina (2X, concentración final de 5 µM) y anticuerpo LANCE cAMP (1:100). Después de la incubación durante 25 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 12 µl de la mezcla de detección de ensayo 40 a cada pocillo. La mezcla de detección se preparó diluyendo biotinacAMP (1:750) y europio W8044 (1:2250) en el tampón de detección provisto con el kit LANCEcAMP. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se leyó como un ensayo TR-FRET en el lector de placas Envision (excitación 320 nm, emisión 615 nm y 665 nm). La fluorescencia de canal 1 (unidades fluorescentes relativas a 615 nm) y la fluorescencia del canal 2 (unidades fluorescentes relativas a 665 nm) junto con su relación se exportaron a un archivo Excel.

Análisis de datos

[0388] Los datos del lector de placas Envision se expresaron como unidades de fluorescencia relativa (RFU) calculadas como (615 nm/665 nm) $\times 10\,000$. Todas las muestras se midieron por triplicado. Los datos se analizaron utilizando el software de análisis de datos interno Crucible, diseñado por Eudean Shaw. Las concentraciones de AMPc desconocidas dentro de cada pocillo se interpolaron a partir de los estándares de referencia de concentraciones de AMPc conocidas incluidas dentro de cada placa. Los parámetros como CE₅₀, Log(CE₅₀), HillSlope (nH), superior e inferior se derivaron trazando los valores de concentración de AMPc sobre las concentraciones de compuestos logarítmicas ajustadas con el modelo 4-P utilizando una aplicación de mínimos cuadrados ponderados no lineal dentro del entorno R (código abierto <http://cran.us.r-project.org/>) implementado por el departamento de Estadísticas y Computación No Clínicas en Janssen R&D.

Tabla 2: Datos *in vitro*

Compuesto	Potencia de isoforma humana (CE ₅₀ nM)				Potencia entre especies (CE ₅₀ nM)		
	hY2	hY1	hY4	hY5	Ratón Y2	Rata Y2	Mono Rhesus Y2
Compuesto 1	0,006	>2910	>2910	345,7	0,004	0,04	0,004
PYY3-36	0,08	66,4	136,7	12,3	0,03	0,50	0,06

Tabla 3: CE₅₀ de isoformas humanas *in vitro* y especies cruzadas

N,º Comp.	CE50 humana (nM)				CE50 entre especies (nM)		
	hY2	hY1	hY4	hY5	mY2	rY2	rhy2
1	0,0065	>2910	>2910	345,7	0,004	0,04	0,004
2	0,012						
3	0,012						
4	7,75						
5	0,42						
6	0,065						
7	0,02	678,7	>1186	10,8			
8	0,295						
9	0,01						
10	0,06						
11	0,015						
12	0,015	1990	520,8	154,5			
13	0,008	>3000	>3000	294,2			
14	0,04						
15	0,25						
16	0,04						
17	0,007						
18	0,0085						
19	0,015						
20	0,0075						
21	0,08						
22	0,0085						
23	0,0075						
24							
25	0,0055						
26	0,0085						

Ejemplo 106: Ensayo de estabilidad en ratones *in vivo*

[0389] Se obtuvieron ratones macho C57BL/6N (de 9 a 12 semanas de edad) de Taconic Laboratory. Los ratones se alojaron de a uno por jaula con ropa de cama AlphaDri en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se permitió a los ratones acceso ad libitum al agua y se los mantuvo con dieta de pienso (5001, Lab Diet).

[0390] Se administró a los ratones una dosis subcutánea de 1 mg/kg de compuesto. Se recogieron aproximadamente 100 µL de sangre de 3 animales en t=4, 24 y 48 horas mediante un corte de cola. También se recogió sangre (aproximadamente 600 µL) de 2-3 animales por punto temporal en t=4, 24 y 48 horas mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre se recogieron en tubos K3E (EDTA) que contenían una proporción del 4 % de solución de inhibidor de proteasa completa y una proporción del 1 % de inhibidor de DPPIV. Las muestras de sangre se colocaron en hielo húmedo antes de centrifugarlas a 10.000 rpm durante 10 minutos en condiciones refrigeradas (~5 °C) para la eliminación de células dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección en cada punto temporal y todo el plasma disponible se transfirió a una placa de 96 pocillos. La placa de pocillos se almacenó en un congelador a -80 °C. Los niveles de compuesto se midieron utilizando el método LCMS descrito a continuación. Los datos se muestran en la Tabla 4.

Ensayos de espectrometría de masas para la determinación del porcentaje restante de conjugado intacto

[0391] Las muestras de plasma se procesaron mediante captura de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo anti-Fc humano, seguido de un análisis de LC de fase inversa-MS de barrido completo de alta resolución en un espectrómetro de masas TOF (tiempo de vuelo) triple. Los espectros de MS sin procesar se deconvolucionaron para dilucidar los pesos moleculares de los componentes en las muestras inyectadas. El pico del ion de la molécula del conjugado intacto se utilizó para cuantificar el conjugado intacto sin cambios. En un ensayo separado, las muestras de plasma se procesaron mediante captura de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo anti-Fc humano, seguido de digestión con tripsina y análisis LC-MSMS de fase inversa en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Se monitoreó un péptido ubicado en Fc del mAb para cuantificar el mAb total. Para ambos ensayos, se prepararon muestras de control de calidad y de curva

estándar añadiendo el estándar de referencia en plasma y procesado utilizando el mismo procedimiento al mismo tiempo que las muestras ingeridas. La relación entre la concentración de conjugado intacto y la de mAb total se calculó como %Remanente.

Tabla 4: Datos de estabilidad *in vivo* en ratones

N.º de comp.	%Rem a las 48 h en el ratón
1	90,8
2	65,6
3	51,8
4	N/A
5	80,4
6	49,7
7	75,4
8	51,6
9	51,5
10	42,4
11	60
12	63,5
13	74,4
14	102
15	N/A
16	96
17	
18	77
19	87,4
20	74,4
21	85,8
22	
23	
24	
25	81,5
26	71,9

Ejemplo 107: Farmacocinética (PK)

PK de ratón DIO

[0392] Se obtuvieron ratones machos DIO C57BL/6N (20 semanas de edad, 14 semanas con dieta alta en grasas) del Laboratorio Taconic. Los ratones se alojaron de a uno por jaula con lecho AlphaDri en una habitación con temperatura controlada y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se permitió a los ratones acceso ad libitum al agua y se les mantuvo con una dieta rica en grasas (D12492, dieta de investigación).

[0393] A los ratones se les administró por vía subcutánea (sc) 1 mg/kg del compuesto 1, se sacrificaron 3 animales en cada punto temporal y se recogieron 15 muestras de sangre en t=4, 8, 24, 48, 72, 120 y 168 horas. También se recogió sangre de 3 animales sin tratamiento previo. Se recogieron aproximadamente 300 µL de sangre de cada animal a través de la vena yugular después de la decapitación bajo anestesia con gas inducido con una mezcla de 70 % de CO₂ y 30 % de O₂. Las muestras de sangre (aproximadamente 300 µL) se recogieron en tubos Sarstedt Microvette® recubiertos con K3E (EDTA) que contenían 12 µL (proporción del 4 %) de solución completa de inhibidor de proteasa y 3 µL (proporción del 1 %) de inhibidor de DPP-IV. Las muestras de sangre se colocaron en hielo húmedo antes de centrifugarlas a 10 000 rpm durante ~4 minutos en condiciones de refrigeración (~5 °C) para la extracción de células dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección en cada punto de tiempo y todo el plasma disponible se transfirió a una placa de 96 pocillos. La placa de pocillos se almacenó en hielo seco hasta que se colocó en un congelador a -80 °C. Los datos se muestran en la Tabla 5 y la Figura 3.

PK de rata

[0394] El compuesto 1 se administró por vía subcutánea e intravenosa a ratas Sprague-Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) a una dosis de 1,0 mg/kg en PBS (pH 7,0-7,6). Se recogieron aproximadamente 500 µL de sangre de tres animales por punto de tiempo a través de la vena safena (t=1, 4, 24, 48, 72, 96, 168 y 240 horas después

de la dosis). Se recogió una muestra de sangre 336 horas después de la dosis a través de la vena yugular después de la decapitación bajo anestesia con gas inducida con una mezcla de 70 % de CO₂ y 30 % de O₂. Las muestras de sangre se recogieron en tubos Sarstedt Microvette® recubiertos con K3E (EDTA) que contenían 20 µL (proporción del 4 %) de solución completa de inhibidor de proteasa y 5 µL (proporción del 1 %) de inhibidor de DPPIV. Las muestras de sangre se colocaron sobre hielo húmedo antes de centrifugarlas a 10 000 rpm durante ~4 minutos en condiciones de refrigeración (~5 °C) para la eliminación de células dentro de los 60 minutos posteriores a la recolección en cada punto de tiempo y todo el plasma disponible se transfirió a una placa de 96 pocillos. Los niveles del compuesto 1 se midieron utilizando el método LCMS que se describe a continuación. Los datos se muestran en la Tabla 6.

10 Mono cinomolgo (Cyno) PK

[0395] Todos los animales ayunaron durante al menos ocho horas antes de la dosificación y durante las primeras cuatro horas de la recolección de la muestra de sangre. Tres animales recibieron una dosis IV única de 1 mg/kg del Compuesto 1 y tres animales recibieron una dosis SC única de 1 mg/kg del Compuesto 1. Se recogió sangre antes de la dosis y a los 1, 6, 10, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432 y 504 minutos horas después de la dosis. Se recogió una muestra adicional a las 0,5 horas después de la dosis para el grupo IV. Se recogió aproximadamente 1 ml de sangre de cada animal en tubos Sarstedt Microvette® recubiertos con K3E (EDTA) que contenían una proporción del 4 % de solución de inhibidor de proteasa completa y una proporción del 1 % de inhibidor de DPPIV. Las muestras de sangre se colocaron en hielo húmedo antes de centrifugarlas dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección en cada punto de tiempo y el plasma resultante se dividió en tercios y se transfirió a una placa de 96 pocillos por triplicado. La placa de pocillos se almacenó en hielo seco hasta que se colocó en un congelador a -80 °C. Los datos se muestran en la Tabla 7 y la Figura 4.

Ensayo de espectrometría de masas intacta para la determinación de los niveles plasmáticos

[0396] Las muestras de plasma se procesaron mediante captura de inmunoafinidad utilizando un anticuerpo anti-Fc humano, seguido de un análisis de LC de fase inversa-MS de barrido completo de alta resolución en un espectrómetro de masas de triple TOF (tiempo de vuelo). Los espectros de MS sin procesar se deconvolucionaron para dilucidar los pesos moleculares de los componentes en las muestras inyectadas. El pico del ion de la molécula del conjugado intacto se utilizó para la cuantificación. Las muestras de curva estándar y de control de calidad se prepararon añadiendo el estándar de referencia al plasma y se procesaron utilizando el mismo procedimiento al mismo tiempo que las muestras ingeridas. Los datos de PK para el ratón DIO, la rata y el cino se muestran en la Tabla 5, la Tabla 6 y la Tabla 7, respectivamente. Los datos de PK para el ratón DIO y el cino también se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

Tabla 5: PK en el ratón DIO

Ensayo	Dosis (mg/kg)	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} ng/mL	AUC _{último} h*ng/mL
Intacto	1,0	81,05	48	8750	995460
IV	1,0	93,0	1	19,5	809,2
SC	1,0	88,7	48	4,2	602,0

Tabla 6: PK en rata

Ensayo	Dosis (mg/kg)	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} ng/mL	AUC _{último} h*ng/mL
IV	1,0	93,0	1	19,5	809,2
SC	1,0	88,7	48	4,2	602,0

Tabla 7: PK en cino

Ensayo	Dosis (mg/kg)	T _{1/2} h	T _{max} h	C _{max} ng/mL	AUC _{último} h*ng/mL
IV	1,0	178,39	10,67	30290	1207,39
SC	1,0	104,32	10	5590	712,19

Ejemplo 108: Estudios de eficacia *in vivo*

Pérdida de peso en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO): dosificación aguda

[0397] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para reducir la ingesta de patas y el peso corporal en ratones macho DIO C57B1/6 después de una dosis única. Los ratones macho DIO C57BL/6N (20 semanas de edad, 14 semanas con dieta rica en grasas) se obtuvieron de Taconic Laboratory. Los ratones se alojaron de a uno por jaula con ropa de cama AlphaDri en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se permitió a los ratones

acceso ad libitum al agua y se mantuvieron con una dieta rica en grasas (D12492, dieta de investigación). Los animales se aclimataron a la instalación durante al menos una semana antes del inicio del experimento.

[0398] El día anterior a la dosificación, los ratones se agruparon en cohortes de ocho animales en función de los pesos corporales individuales. A las 3:00-4:00 pm del día siguiente, los animales se pesaron y se trataron con vehículo (dPBS, pH 7,2), Compuesto 1 a una dosis de 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 o 7,5 nmol/kg, o Dulaglutida a 0,3 nmol/kg mediante administración subcutánea (sc). Se midieron los pesos corporales y la ingesta de alimentos 24 h, 48 h y 72 h después de la dosificación y se calcularon los porcentajes de pérdida de peso y reducción en la ingesta de alimentos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de medidas repetidas de dos vías con prueba posterior de Tukey en Prism. Todos los datos se presentan como la media $\pm$ SEM (Figura 5 y Figura 6).

Pérdida de peso en ratones obesos inducidos por la dieta: dosificación crónica

[0399] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para reducir la ingesta de nutrientes y el peso corporal y mejorar la homeostasis de la glucosa en dosis repetidas en ratones DIO C57B1/6 macho durante un período de 8 días. Los ratones DIO C57BL/6N macho (de 20 semanas de edad, 14 semanas con dieta rica en grasas) se obtuvieron de Taconic Laboratory. Los ratones se alojaron de a uno por jaula con ropa de cama AlphaDri en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. A los ratones se les permitió acceso ad libitum al agua y se los mantuvo con una dieta rica en grasas (D12492, dieta de investigación). Los animales se aclimataron a las instalaciones durante al menos una semana antes del inicio del experimento.

[0400] El día anterior a la dosificación, los ratones se agruparon en función de los pesos corporales individuales. A las 3:00 - 4:00 pm durante cada uno de los siguientes 8 días, se pesaron los animales y la ingesta de alimentos. Los animales fueron tratados con vehículo (dPBS, pH 7,2) o dulaglutida a 0,3 nmol/kg mediante administración subcutánea todos los días o Compuesto 1 en dosis de 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 nmol/kg mediante administración subcutánea cada tres días. Después de 8 días, los ratones ayunaron durante 5 horas y luego se les administró un bolo de 2 g/kg de glucosa por vía oral en $t = 0$. En $t = 0, 30, 60, 90$ y 120 minutos después de la provocación con glucosa, se midió la glucosa en sangre y en $t = 0, 30$ y 90 minutos se extrajo sangre para medir la insulina plasmática. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA unidireccional o ANOVA de medidas repetidas bidireccional con prueba posterior de Tukey en Prism. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM (Figura 7, Figura 8 y Tablas 8-11).

Tabla 8: Efecto del compuesto 1 en el peso corporal (g) durante 8 días de tratamiento

Tratamiento	Vehículo	Compuesto 1 (nmol/kg)				Dulaglutida
Día	n/a	0,1	0,3	1,0	3,0	0,3
-1	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,7 $\pm$ 0,8	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6
0	46,1 $\pm$ 0,7	46,0 $\pm$ 0,6	46,8 $\pm$ 0,7	46,3 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,6	45,9 $\pm$ 0,6
1	45,8 $\pm$ 0,7	45,0 $\pm$ 0,6	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,5	43,9 $\pm$ 0,6	44,1 $\pm$ 0,6
2	45,2 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	43,6 $\pm$ 0,7	42,4 $\pm$ 0,7*	41,8 $\pm$ 0,7*	42,2 $\pm$ 0,6*
3	45,1 $\pm$ 0,7	43,9 $\pm$ 0,6	42,8 $\pm$ 0,6	41,0 $\pm$ 0,6*	40,1 $\pm$ 0,6*	40,6 $\pm$ 0,6*
4	44,7 $\pm$ 0,7	43,4 $\pm$ 0,6	42,0 $\pm$ 0,6	39,9 $\pm$ 0,6*	38,5 $\pm$ 0,6*	39,3 $\pm$ 0,6*
5	44,5 $\pm$ 0,7	43,0 $\pm$ 0,6	41,5 $\pm$ 0,5*	39,1 $\pm$ 0,6*	36,8 $\pm$ 0,7*	38,1 $\pm$ 0,7*
6	44,5 $\pm$ 0,7	43,1 $\pm$ 0,6	41,4 $\pm$ 0,5*	38,6 $\pm$ 0,6*	35,5 $\pm$ 0,8*	37,1 $\pm$ 0,8*
7	44,3 $\pm$ 0,7	43,1 $\pm$ 0,7	41,3 $\pm$ 0,5*	38,2 $\pm$ 0,6*	34,8 $\pm$ 0,9*	36,4 $\pm$ 1,0*
8	45,2 $\pm$ 0,6	46,3 $\pm$ 0,7	41,9 $\pm$ 0,5*	38,8 $\pm$ 0,6	34,7 $\pm$ 1,0*	36,5 $\pm$ 1,1*

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por vez por grupo
 * $p < 0,05$, versus vehículo; ANOVA de dos vías RM, prueba de comparación de múltiplo de Tukey

Tabla 9: Efecto del compuesto 1 sobre los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) después de 8 días de tratamiento

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después de exposición de glucosa (min)					Total AUC (mg/dl/ 120min)	Delta AUC (mg/dl/ 120min)
		0	30	60	90	120		
Vehículo	NA	148±6	227±15	272±12	206±9	209 ±13	26492± 1232	8702± 1082
Comp. 1	0,1	151±4	213±9	249±10	186±11	194 ±15	24598±849	6433±677
	0,3	137±6	191±11	208 ±10*	146±8*	160±8*	20786±728*	4379±364*
	1,0	117±5	146±9*	203 ±10*	135±8*	136±5*	18285±769*	4319±522*
	3,0	73±11*	129±5*	149 ±10*	93±9*	101±9*	13703±913*	5004±585
Dulaglutida	0,3	76±9*	151 ±14*	174 ±17*	104 ±10*	119±9*	15758± 1054*	6668± 1846

Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por tiempo por grupo
 *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de dos vías RM de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey para valores de glucosa; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey para AUC

Tabla 10: Efecto del compuesto 1 sobre los niveles de insulina (ng/mL) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTGO) después de 8 días de tratamiento

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Tiempo después de exposición de glucosa			Total AUC (mg/dl/120min)
		0	30	90	
Vehículo	NA	5,6±1,4	11,3±3,0	4,0±0,6	711,4±164,1
Comp. 1	0,1	3,0±0,4	6,6±0,8*	2,4±0,2	415,6±44,2
	0,3	2,3±0,2	4,0±0,6*	1,7±0,2	264,3±33,0*
	1,0	1,3±0,2*	2,2±0,1*	1,1±0,2	151,6±12,5*
	3,0	0,4±0,1*	1,2±0,1*	0,4±0,1*	73,9±9,0*
Dulaglutida	0,3	0,6±0,1*	1,7±0,2*	0,7±0,2	108,8±12,3*

Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por tiempo por grupo
 *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de dos vías RM de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey para valores de glucosa; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey para AUC

Tabla 11: Efecto del compuesto 1 sobre los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) después de 8 días de tratamiento

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Glucosa en sangre (mg/dL)
Vehículo	NA	180±5
Compuesto 1	0,1	164±6
	0,3	160±5
	1,0	149±6
	3,0	105±12*
Dulaglutida	0,3	114±13*

Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por vez por grupo *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey

Pérdida de peso en ratones obesos inducidos por la dieta en combinación con liraglutida: dosificación crónica

[0401] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para reducir la ingesta de patas y el peso corporal y mejorar la homeostasis de la glucosa en combinación con un agonista de GLP-1 de acción prolongada, liraglutida, en dosis repetidas en ratones DIO C57B1/6 macho durante un período de 9 días.

[0402] Se obtuvieron ratones machos DIO C57BL/6N (20 semanas de edad, 14 semanas con dieta alta en grasas) del Laboratorio Taconic. Los ratones se alojaron de a uno por jaula con lecho AlphaDri en una habitación con temperatura controlada y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se permitió a los ratones acceso ad libitum al agua y se les mantuvo con una dieta rica en grasas (D12492, dieta de investigación). Los animales se aclimataron a las instalaciones durante al menos una semana antes del inicio del experimento.

[0403] El día anterior a la dosificación, se midió la composición corporal mediante resonancia magnética y los ratones se agruparon en función de los pesos corporales individuales. El día 0, entre las 15:00 y las 16:00 horas, se pesaron los animales y la ingesta de alimentos. Los animales de los grupos de tratamiento único se trataron con vehículo (dPBS, pH 7,2) o liraglutida a 10 nmol/kg mediante administración subcutánea todos los días o el compuesto 1 a dosis de 0,1 o 1,0 nmol/kg mediante administración subcutánea cada tres días. Los animales de los grupos de combinación recibieron liraglutida (10 nmol/kg) diariamente y el compuesto 1 a dosis de 0,1 o 1,0 nmol/kg cada tres días. El día 8, se midió la composición corporal mediante resonancia magnética. El día 9, los ratones ayunaron durante 5 horas y se midieron la glucemia y la insulina en ayunas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía o ANOVA de medidas repetidas de dos vías con prueba posterior de Tukey en Prism. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM (Figura 9 y Tablas 12-17).

Tabla 12: Efecto del compuesto 1, liraglutida y combinaciones del compuesto 1 y liraglutida sobre la ingesta diaria de alimentos (g) durante 9 días de tratamiento.

Tratamiento	Vehículo	Compuesto 1 (nmol/kg)				
		0,1	1,0 l	n/a l	0,1	1,0
		Liraglutida (nmol/kg)				
Día	n/a	n/a	n/a	10,0	10,0	10,0
0	2,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1
1	2,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2*	1,2 $\pm$ 0,1*	1,1 $\pm$ 0,1*	0,8 $\pm$ 0,1*	0,5 $\pm$ 0,1*
2	2,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1*	1,1 $\pm$ 0,1*	0,7 $\pm$ 0,1*	0,2 $\pm$ 0,1*
3	2,5 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2*	1,5 $\pm$ 0,2*	1,2 $\pm$ 0,1 [^]	0,5 $\pm$ 0,1*
4	2,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1*	1,9 $\pm$ 0,2*	1,2 $\pm$ 0,2*	0,3 $\pm$ 0,1*
5	2,4 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1*	1,3 $\pm$ 0,2 [^]	0,5 $\pm$ 0,1*
6	2,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1*	1,5 $\pm$ 0,2 [^]	0,3 $\pm$ 0,1 [^]
7	2,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1*	0,3 $\pm$ 0,2 [^]
8	2,9 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1 [^]	2,3 $\pm$ 0,1*	1,8 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,1*	0,5 $\pm$ 0,2 [^]
9	1,8 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2 [^]

Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por vez por grupo, excepto n==7 cuando anotado por [^] *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de dos vías RM, comparación múltiple de Tukey

Tabla 13: Efecto del compuesto 1, liraglutida y combinaciones del compuesto 1 y liraglutida sobre el peso corporal (g) durante 9 días de tratamiento.

Tratamiento	Vehículo	Compuesto 1 (nmol/kg)				
		0.1	1.0	n/a	0.1	1.0
		Liraglutida (nmol/kg)				
Día	n/a	n/a	n/a	10.0	10.0	10.0
-1	46.8±0.5	46.8±0.5	46.8±0.5	46.8±0.5	46.8±0.5	46.8±0.4
0	46.9±0.4	46.8±0.5	46.8±0.5	47.0±0.5	46.8±0.5	47.0±0.4
1	47.0±0.5	46.4±0.5	45.5±0.5	45.6±0.4	44.9±0.5*	44.3±0.4*
2	46.8±0.5	45.9±0.5	44.1±0.4*	44.4±0.5 *	43.7±0.5*	42.4±0.5*
3	46.6±0.5	45.8±0.5	43.5±0.5*	43.9±0.6*	43.0±0.5*	40.9±0.4*
4	46.5±0.4	45.7±0.5	43.2±0.4*	43.6±0.6*	42.1±0.4*	39.1±0.5*
5	46.4±0.5	45.5±0.6	42.7±0.4*	43.3±0.6*	41.2±0.5 *	37.4±0.4*
6	46.8±0.5	46.0±0.6	43.0±0.5*	43.2±0.6*	40.7±0.5 *	35.9±0.5*
7	46.7±0.5	45.8±0.6	42.9±0.5 *	43.2±0.7*	40.3±0.5*	34.4±0.4*
8	46.6±0.5	45.5±0.6	42.6±0.5 *	42.4±0.6*	39.5±0.4*	33.2±0.5*
9	47.0±0.6	45.8±0.6	43.1±0.5*	42.6±0.6*	39.4±0.4*	32.5±0.5*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por vez por grupo
 *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de dos vías RM, prueba de comparación múltiple de Tukey

Tabla 14: Comparación del compuesto 1 administrado conjuntamente y liraglutida en el cambio porcentual del peso corporal versus la suma del cambio porcentual del peso corporal del compuesto 1 o liraglutida administrados solos en el día 9.

Tratamiento	Compuesto 1 (nmol/kg)			Suma de Comp 1 (0,1) y Lira (10,0)	Compuesto 1 (nmol/kg)			Suma de Comp 1 (0,1) y Lira (10,0)
	0.1	n/a	10.1		1.0	n/a	1.0	
Día	Liraglutida (nmol/kg)				Liraglutida (nmol/kg)			
	n/a	10.0	10.0		n/a	10.0	10.0	
9	-2.2±0.7	-9.3 ±1.1	-15.8 ±0.8*	-11.5±1.1*	-7.8±1.1	-9.3 ±1.1	-30.8 ±0.9*	-17.1±1.9*

Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por vez por grupo

*p<0.05, suma del compuesto 1 y liraglutida frente a la co-dosificación, ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey

Tabla 15: Efecto del compuesto 1, liraglutida y combinaciones de compuesto 1 y liraglutida sobre la glucosa en sangre (mg/dL), la insulina y el HOMA-IR después de 9 días de tratamiento.

		Compuesto 1 (nmol/kg)				
		0,1	1,0	n/A	0,1	1,0
	Vehículo	Liraglutida (nmol/kg)				
	n/A	n/A	n/A	10,0	10,0	10,0
Glucemia en sangre alimentada (mg/dl)	140,8 ± 11,7	132,6 ± 2,9	126,4 ± 5,1	112,5 ± 4,3	112,9 ± 6,7	79,4 ± 10,1*
Sangre en ayunas glucosa (mg/dl)	173,8 ± 7,8	149,8 ± 4,9	133,1 ± 6,6*	124,1 ± 4,9*	109,8 ± 4,3*	68,6 ± 7,7*
Insulina en ayunas (ng/mL)	7,2 ± 1,1	8,1±1,1	5,8 ± 0,9	3,9 ± 0,6*	1,9 ± 0,3*	0,5 ± 0,1 *
HOMA-IR	92,1 ± 18,6	86,4 ± 10,7	54,7 ± 9,2	34,8 ± 6,0*	14,5 ± 2,6*	2,9 ± 0,6*
Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por vez por grupo						
*p<0.05. versus vehículo: ANOVA de una vía. prueba de comparación múltiple de Tukey						

Tabla 16: Efecto del compuesto 1, liraglutida y combinaciones del compuesto 1 y liraglutida sobre la composición corporal (g) medida por resonancia magnética después de 8 días de tratamiento.

Tratamiento	Vehículo	Compuesto 1 (nmol/kg)				
		0.1	1.0	n/a	0.1	1.0
		Liraglutida (nmol/kg)				
	n/a	n/a	n/a	10.0	10.0	10.0
Grasa(g) Día1	18.6±0.4	18.6±0.4	18.8±0.6	18.2±0.5	18.1±0.6	18.1±0.7
Grasa(g) Día8	18.9±0.4	18.3±0.5	16.1±0.8*	15.6±0.5*	13.3±0.4*	9.3±0.7*
Magro(g) Día 1	26.3±0.4	26.3±0.4	26.1±0.7	26.6±0.5	26.7±0.5	27.0±0.6
Magro(g) Día 8	25.9±0.5	25.4±0.3	24.7±0.6	25.0±0.5	24.4±0.4	22.1±0.4*

Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por vez por grupo *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey

Tabla 17: Efecto del compuesto 1, liraglutida y combinaciones del compuesto 1 y liraglutida sobre la composición corporal (%) medida por resonancia magnética después de 8 días de tratamiento.

Tratamiento	Vehículo	Compuesto 1 (nmol/kg)				
		0.1	1.0	n/a	0.1	1.0
		Liraglutida (nmol/kg)				
	n/a	n/a	n/a	10.0	10.0	10.0
Graso(%) Día 1	39.0±0.8	39.1±0.6	39.4±1.3	38.3±0.9	38.1±1.1	38.1±1.3
Graso(%) Día 8	39.9±0.8	39.6±0.6	37.3±1.6	36.2±0.9	33.4±0.9*	27.7±1.7*
Magro(%) Día 1	55.3±0.8	55.2±0.6	54.9±1.3	56.0±1.0	56.0±1.2	56.8±1.3
Magro(%) Día 8	54.7±0.7	55.1±0.6	57.4±1.5	58.1±0.9	61.2±1.0*	66.3±1.7*
Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por vez por grupo *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey						

Ejemplo 109: Efecto de una dosis única del compuesto 1 sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratas Sprague-Dawley

[0404] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para reducir la ingesta de patas y el peso corporal en Sprague-Dawley después de una dosis única. Los animales se obtuvieron de Charles River Labs (Wilmington, MA) con un peso corporal de 200-225 g y se utilizaron dentro de una semana después del parto. Se alojaron uno por jaula en lecho seco alfa y un tubo de plástico para enriquecimiento en una habitación con temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se les permitió acceso ad libitum al agua y se les alimentó con una dieta para roedores de laboratorio; PicoLab® RodentDiet 20, 5K75* irradiado y certificado (suministrado por PurinaMills, St. Louis, MO a través de ASAP Quakertown, PA). Se tomaron y registraron los pesos de los animales de cada rata antes de la dosificación.

[0405] El día anterior a la dosificación, las ratas se agruparon en cohortes de ocho animales en función de los pesos corporales individuales. Al día siguiente, los animales se pesaron y se trataron con vehículo (dPBS, pH 7,2), Compuesto 1 a una dosis de 0,1, 0,3, 1,0 o 15 3,0 nmol/kg, o dulaglutida a 0,3 nmol/kg mediante administración subcutánea. Se midieron los pesos corporales y la ingesta de alimentos 1, 2 76 y 3 días después de la dosificación y se calcularon los porcentajes de pérdida de peso y reducción en la ingesta de alimentos. Se realizaron análisis estadísticos utilizando ANOVA de medidas repetidas de dos vías con prueba posterior de Tukey en Prism. Todos los datos se presentan como la media $\pm$ SEM (Tablas 18-20).

Tabla 18: Efecto de una dosis única del compuesto 1 sobre la ingesta diaria de alimentos y el consumo total de alimentos durante tres días en ratas Sprague-Dawley.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Consumo de alimentos total
Vehículo		26.7 $\pm$ 0.7	28.6 $\pm$ 1.0	29.4 $\pm$ 0.7	29.7 $\pm$ 0.8	87.7 $\pm$ 1.6
Compuesto 1	0.1	25.9 $\pm$ 1.0	27.6 $\pm$ 1.0	29.1 $\pm$ 1.0	29.1 $\pm$ 1.0	85.7 $\pm$ 2.7
	0.3	24.3 $\pm$ 0.7	25.8 $\pm$ 1.1	27.2 $\pm$ 1.3	27.9 $\pm$ 0.9	80.9 $\pm$ 2.7
	1	27.0 $\pm$ 1.1	23.7 $\pm$ 0.6*	25.0 $\pm$ 2.0*	27.1 $\pm$ 0.9	75.8 $\pm$ 3.2*
	3	27.0 $\pm$ 0.8	19.6 $\pm$ 1.4*	19.1 $\pm$ 1.0*	23.6 $\pm$ 1.0*	62.3 $\pm$ 2.5*
Dulaglutida	0.3	26.6 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 1.2	30.0 $\pm$ 0.7	30.1 $\pm$ 0.7	87.4 $\pm$ 2.0
Los valores representan la media $\pm$ SEM para los datos de 8 animales por vez por grupo						
*p<0,05, versus vehículo; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Dunnett para el consumo total de alimentos; ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Tukey para el consumo diario de alimentos						

Tabla 19: Efecto de una dosis única del compuesto 1 sobre el peso corporal absoluto durante tres días en ratas Sprague-Dawley.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Vehículo		263.9 $\pm$ 4.9	271.6 $\pm$ 4.7	281.2 $\pm$ 5.0	289.5 $\pm$ 5.3	299.0 $\pm$ 5.9
Compuesto 1	0.1	266.0 $\pm$ 2.3	274.1 $\pm$ 2.9	284.3 $\pm$ 2.7	293.3 $\pm$ 2.8	301.4 $\pm$ 2.8
	0.3	264.9 $\pm$ 3.6	270.8 $\pm$ 3.8	278.2 $\pm$ 4.5	285.9 $\pm$ 4.8	294.3 $\pm$ 4.9
	1	266.5 $\pm$ 3.6	276.1 $\pm$ 3.7	280.9 $\pm$ 3.7	287.1 $\pm$ 4.5	294.3 $\pm$ 4.1
	3	265.1 $\pm$ 3.6	272.7 $\pm$ 3.4	274.8 $\pm$ 3.8	275.7 $\pm$ 3.4*	282.1 $\pm$ 3.7*
Dulaglutida	0.3	264.0 $\pm$ 3.1	270.3 $\pm$ 3.0	280.8 $\pm$ 4.2	292.47 $\pm$ 3.6	299.0 $\pm$ 3.3
Los valores representan la media $\pm$ SEM para datos de 8 animales por vez por grupo						
*p<0,05, versus vehículo; ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Tukey						

Tabla 20: Efecto de una dosis única del compuesto 1 sobre el cambio de peso corporal durante tres días en ratas Sprague-Dawley.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Vehículo		-7.7 ± 1.5	0.0 ± 0.0	9.6 ± 1.5	18.0 ± 1.4	27.4 ± 1.8
Compuesto 1	0.1	-8.2 ± 0.9	0.0 ± 0.0	10.2 ± 1.6	19.1 ± 1.0	27.3 ± 1.4
	0.3	-5.9 ± 0.9	0.0 ± 0.0	7.3 ± 1.1	15.1 ± 1.1	23.4 ± 1.7
	1	-9.7 ± 0.8	0.0 ± 0.0	4.7 ± 0.8*	11.0 ± 1.4*	18.2 ± 1.0*
	3	-7.6 ± 1.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 1.6*	3.0 ± 1.5*	9.4 ± 1.9*
Dulaglutida	0.3	-6.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	10.6 ± 1.6	22.5 ± 0.8	28.7 ± 0.6
Los valores representan la media ± SEM para datos de 8 animales por vez por grupo *p<0,05, versus vehículo; ANOVA de una vía, prueba de comparación múltiple de Tukey para cambio neto en peso corporal en día 3; ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Tukey para cambio diario en peso corporal						

Ejemplo 110: Efectos del compuesto 1, solo o en combinación con liraglutida, en macacos rhesus obesos

[0406] Se evaluó el compuesto 1 por su capacidad para reducir la ingesta de patas en macacos rhesus obesos. También se evaluó la eficacia de la administración concomitante de liraglutida con una dosis eficaz del compuesto 1. En primer lugar, se realizó un estudio abreviado de rango de dosis para determinar la dosis de liraglutida que se utilizaría durante la administración concomitante. Seis animales recibieron una única administración subcutánea diaria de solución salina durante tres semanas. Se midió la ingesta de alimentos diariamente y la ingesta de alimentos de referencia se estableció como la ingesta diaria promedio durante las tres semanas de tratamiento con el vehículo. Luego, los seis animales se dividieron en dos grupos: 0,01 mg/kg (n=3) y 0,02 mg/kg (n=3). Cada uno recibió una dosis subcutánea diaria de liraglutida durante una semana para determinar los efectos sobre la ingesta de alimentos en relación con el valor inicial y para identificar una dosis máxima tolerable. También se midió la ingesta de alimentos durante dos semanas después de interrumpir el tratamiento con liraglutida. Todos los datos se presentan como la ingesta de alimentos semanal media ± SEM (Figura 10).

[0407] Se utilizaron diez (10) macacos rhesus obesos para evaluar la eficacia del compuesto 1. Después de un período de referencia de 2 semanas, se administró el compuesto 1 por vía subcutánea diariamente durante 4 semanas. Se administró a los animales una dosis de 0,01 mg/kg durante 7 días, luego 7 días a 0,03 mg/kg, luego 9 días a 0,015 mg/kg y, finalmente, 5 días de co-dosificación del compuesto 1 a 0,015 mg/kg en combinación con liraglutida a 0,01 mg/kg. Se controló la ingesta de alimentos diariamente y se midió el peso corporal semanalmente. Se evaluaron los niveles de glucosa, insulina, colesterol total, HDL, LDL, ALT y AST al inicio, después del tratamiento con el compuesto 1 y después del tratamiento combinado. Todos los datos se presentan como la media ± SEM (Tablas 21-22 y Figuras 11 y 12).

Tabla 21: Efecto del compuesto 1 con adición de liraglutida sobre la ingesta de alimentos en macacos rhesus obesos

Días de tratamiento	Compuesto 1 (mg/kg)			
	0,01	0,03	0,015	0,015 ± liraglutida
Línea base de 2 semanas	190 ± 15			
1	160 ± 9	149 ± 12	117 ± 18	50 ± 11
2	167 ± 19	149 ± 14	72 ± 14	13 ± 5
3	175 ± 13	94 ± 16	72 ± 12	15 ± 10
4	196 ± 14	181 ± 13	86 ± 14	34 ± 17
5	166 ± 15	101 ± 12	77 ± 8	34 ± 12
6	180 ± 14	99 ± 27	91 ± 12	
7	146 ± 12	73 ± 11	75 ± 4	
8			97 ± 12	
9			118 ± 21	

Tabla 22: Efecto del compuesto 1 con adición de liraglutida sobre el peso corporal en macacos rhesus obesos

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Peso corporal (kg)
Pre-dosis	N/A	15,8 ± 0,9
Compuesto 1	0,01	15,9 ± 0,9
	0,03	15,7 ± 0,9
	0,015	15,4 ± 0,8*
Compuesto 1 ± liraglutida	0,015	15,0 ± 0,8*

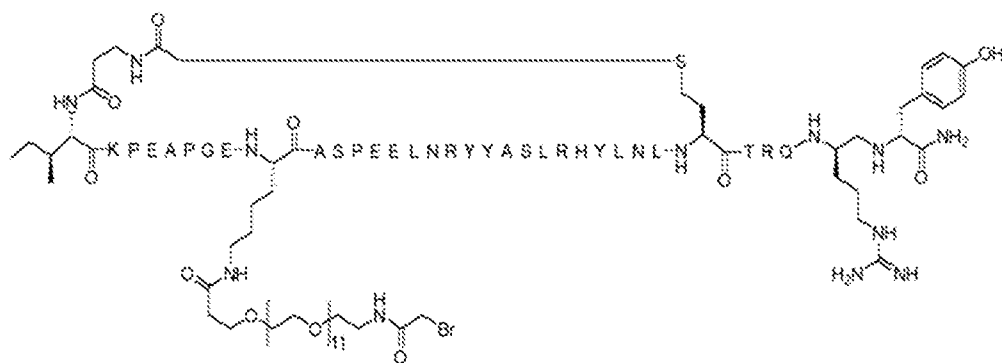
Los valores representan la media ± SEM para los datos de 8 animales por grupo
 *p<0,05, frente al vehículo
 ANOVA unidireccional RM, Prueba de comparación múltiple de Dunnett

[0408] Las secuencias PYY cíclicas ejemplares o conjugados de las mismas de la invención incluyen:

SEQ ID NO: 1

Nombre: [Ciclo-(βA2COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(35R,36Y)]-PYY2-36

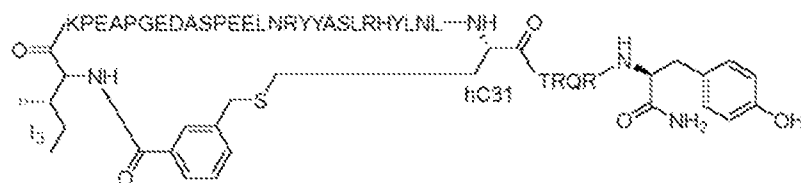
Estructura:



SEQ ID NO: 2

Nombre: [Ciclo-(I3-m-COPhCH₂hC31)]-PYY3-36

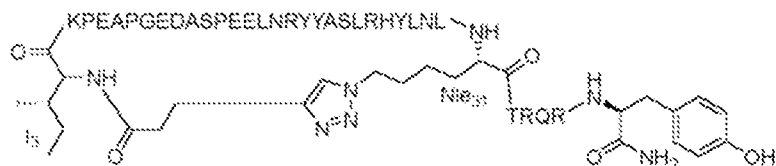
Estructura:



SEQ ID NO: 3

Nombre: [Ciclo-(I3-CO(CH₂)₂triazolil-Nle31)]-PYY3-36

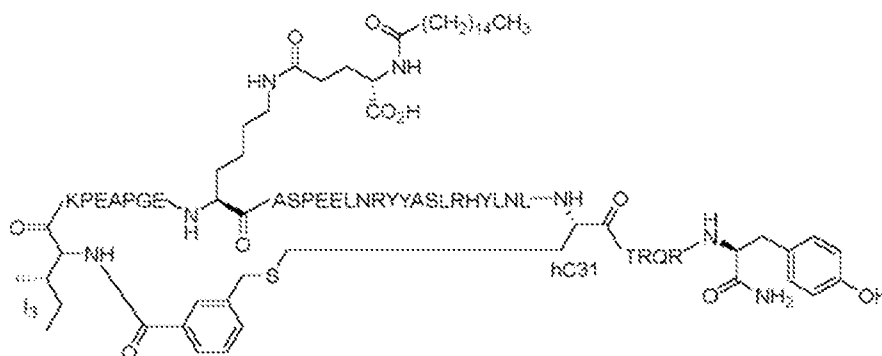
Estructura:



SEQ ID NO: 4

Nombre: [Ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)11]-PYY3-36

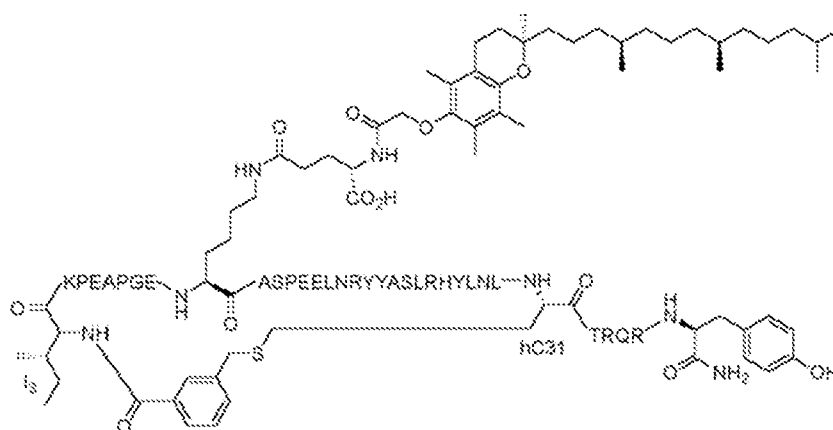
Estructura:



SEQ ID NO: 5

Nombre: [Ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-AcVitE)11]-PYY3-36

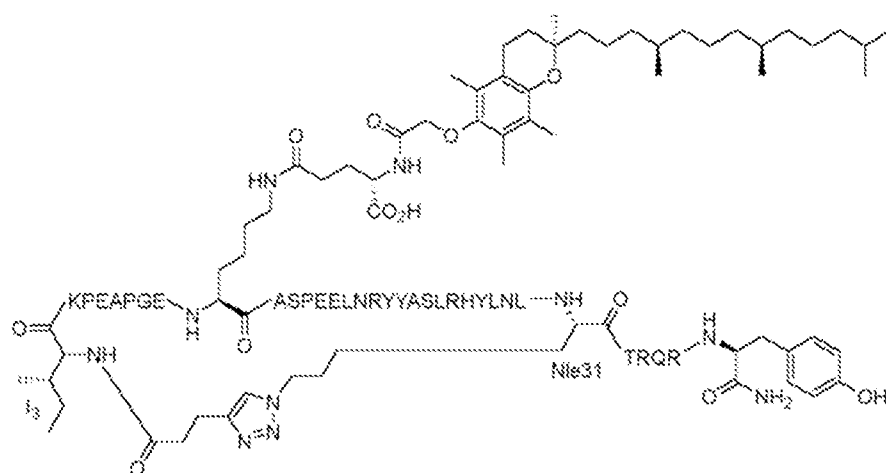
Estructura:



SEQ ID NO: 6

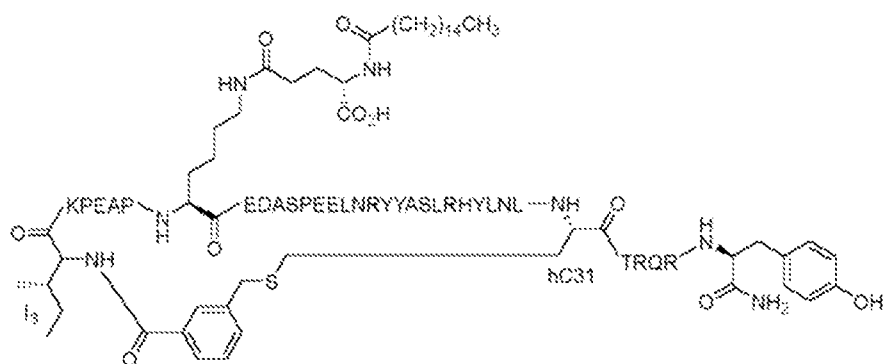
Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂triazolil-Nle31), K(γ-Glu-AcVitE)11]-PYY3-36

Estructura:



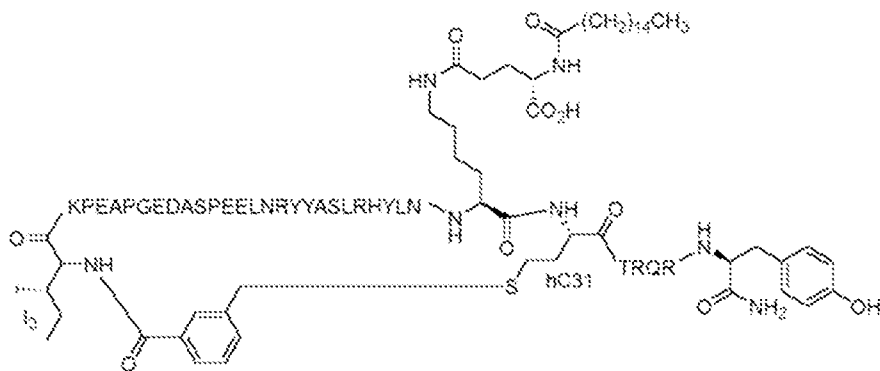
SEQ ID NO: 7

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)9]-PYY3-36
Estructura:



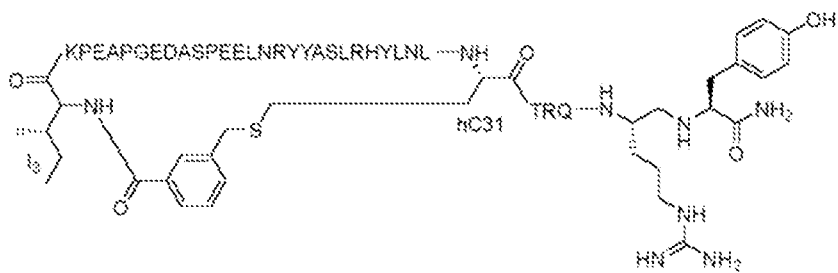
SEQ ID NO: 8

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 9

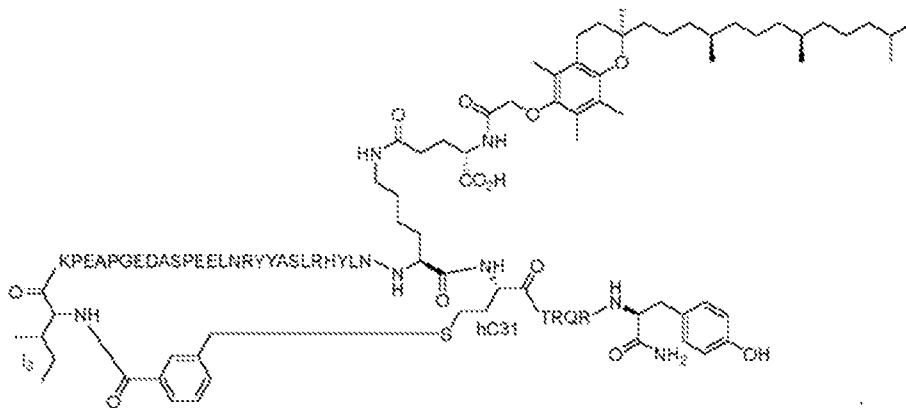
Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), psi-(R35Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 10

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂hC31), K(γ-Glu-AcVitE)30]-PYY3-36

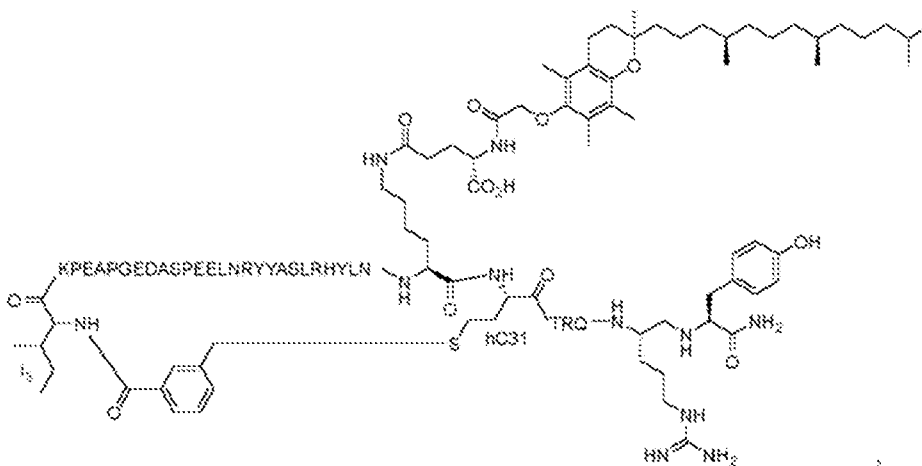
Estructura:



SEQ ID NO: 11

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K(y-GluAcVitE)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

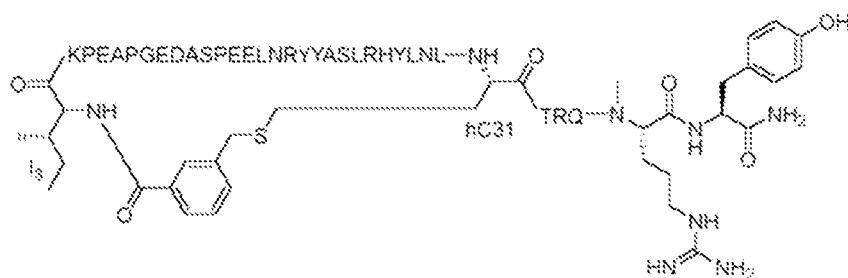
Estructura:



SEQ ID NO: 12

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), (N-MeR35)]-PYY3-36

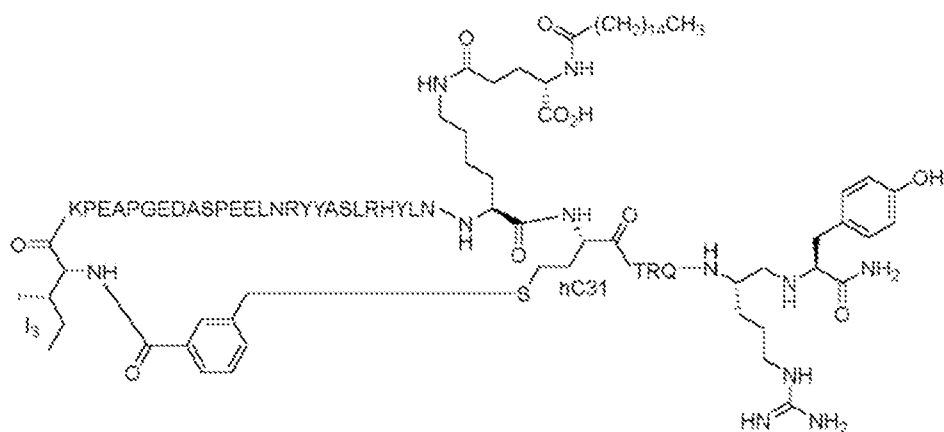
Estructura:



SEQ ID NO: 13

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

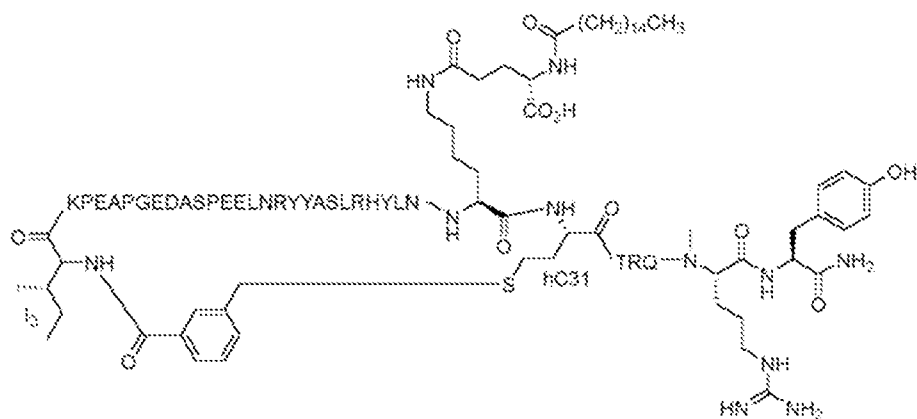
Estructura:



SEQ ID NO: 14

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35)]-PYY3-36

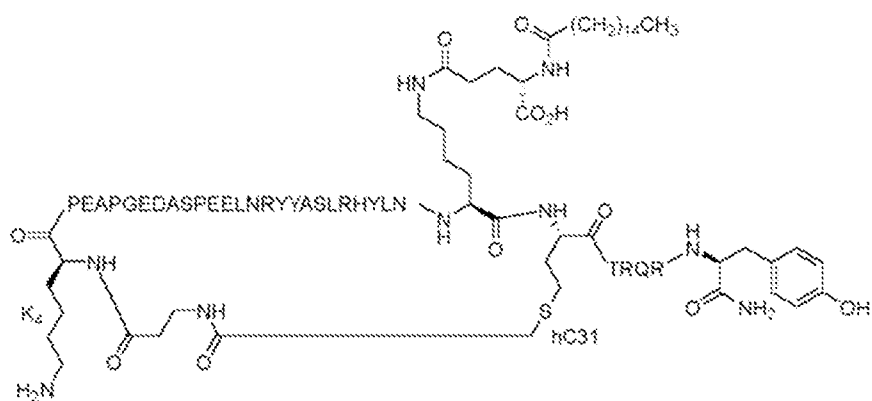
Estructura:



SEQ ID NO: 15

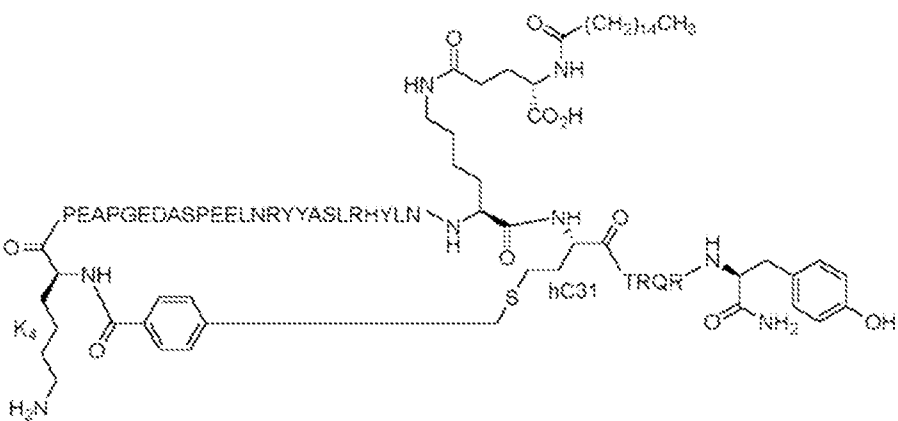
Nombre: [ciclo-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30]-PYY4-36

Estructura:



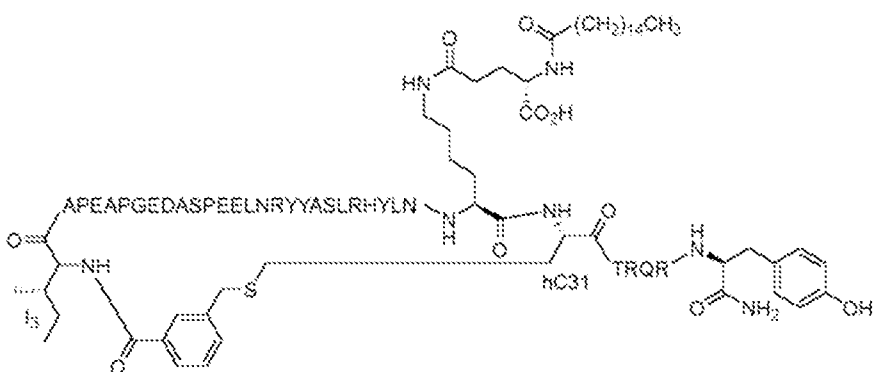
SEQ ID NO: 16

Nombre: [ciclo-(K4- *p*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30]-PYY4-36
Estructura:



SEQ ID NO: 17

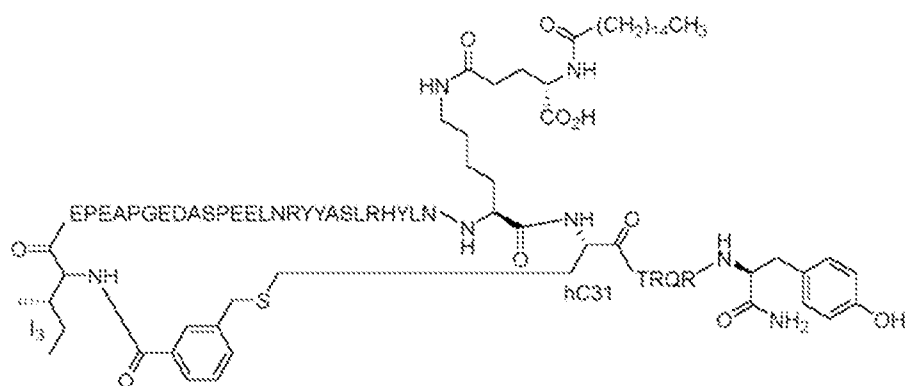
Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), A4, K(y-Glu-Pal)30]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 18

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), E4, K(y-GluPal)30]-PYY3-36

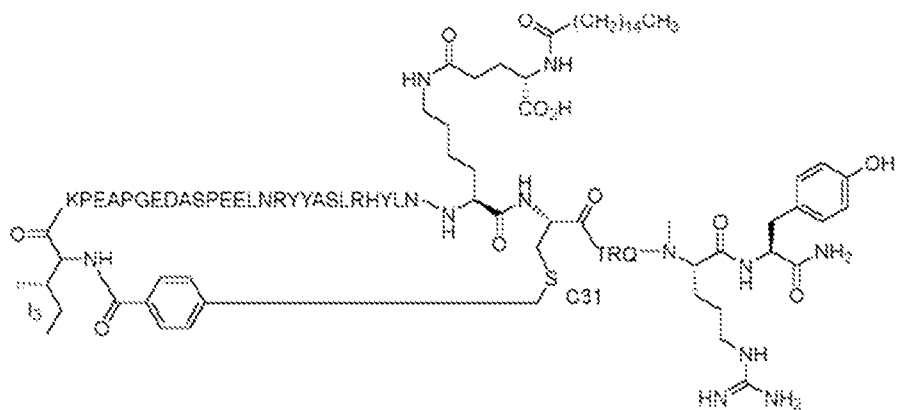
Estructura:



SEQ ID NO: 19

Nombre: [ciclo-(I3-*p*-COPhCH₂-C31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35)]-PYY3-36

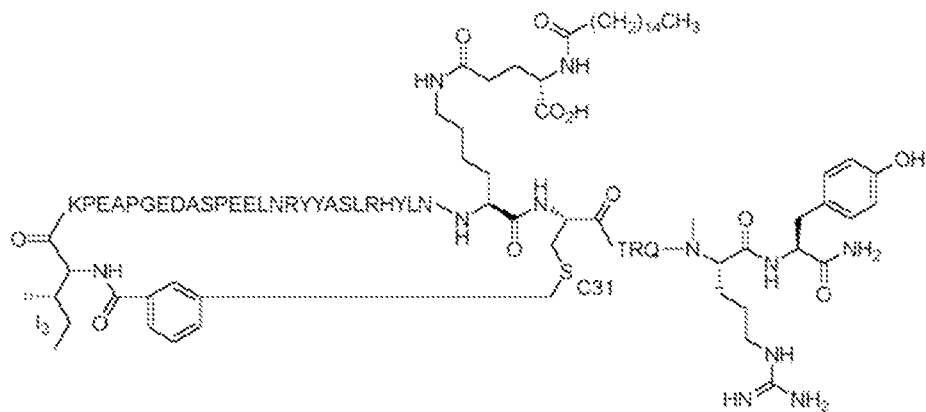
Estructura:



SEQ ID NO: 20

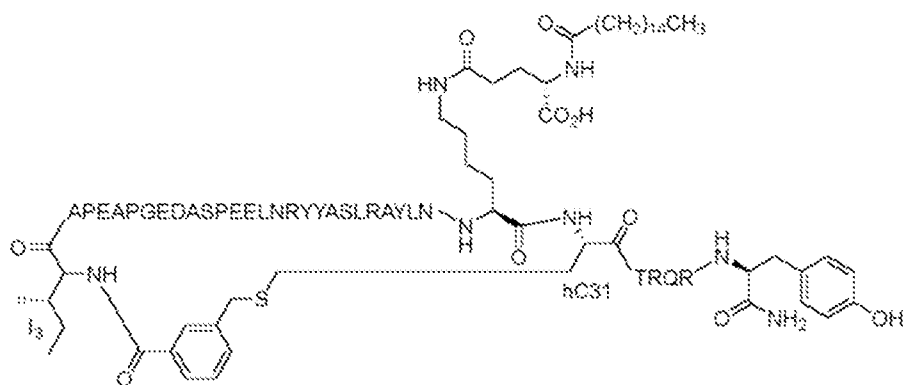
Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-C31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35)]-PYY3-36

Estructura:

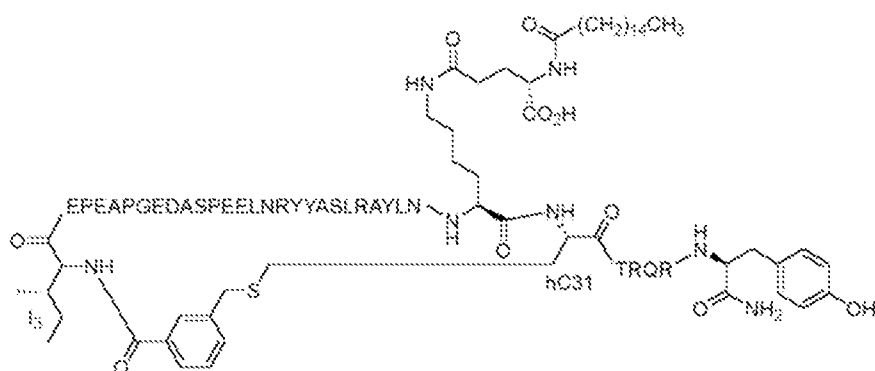


SEQ ID NO: 21

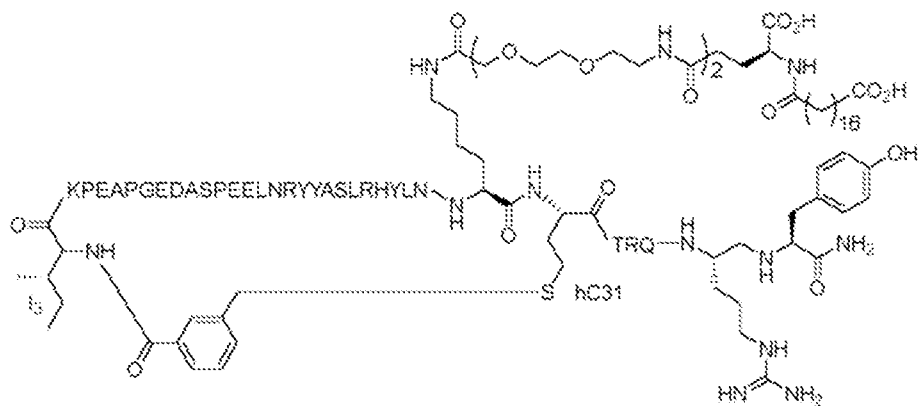
Estructura:



Estructura:

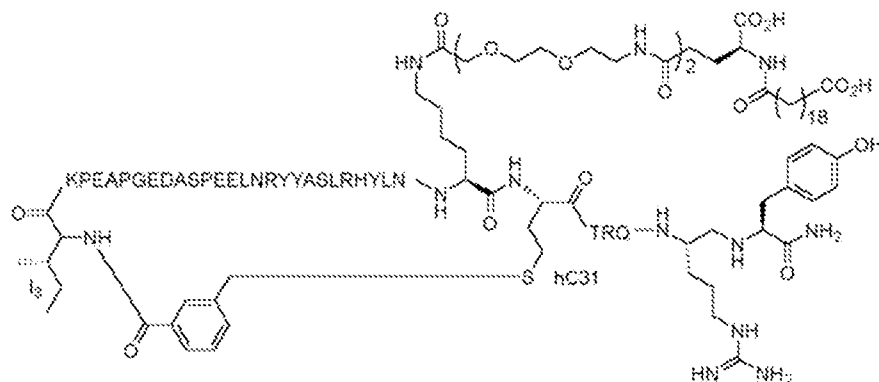


Estructura:



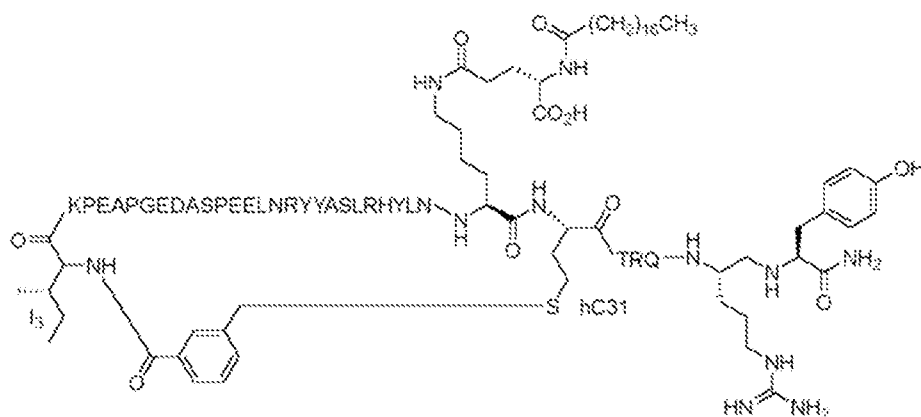
SEQ ID NO: 24

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₈CO₂H)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



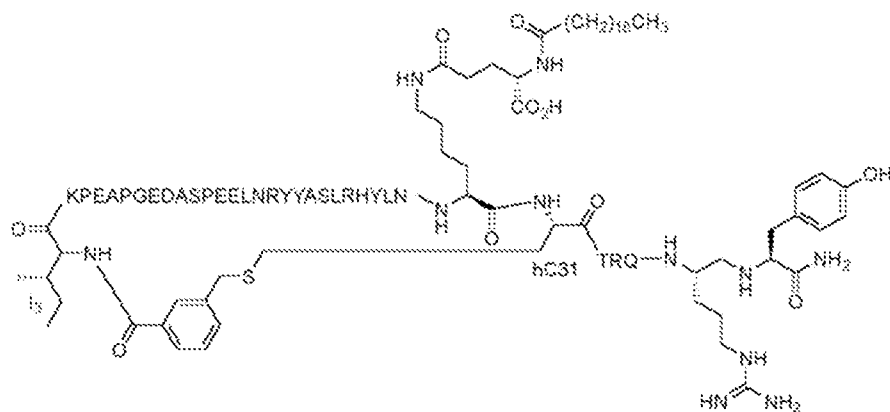
SEQ ID NO: 25

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Stear)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 26

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Arach)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:

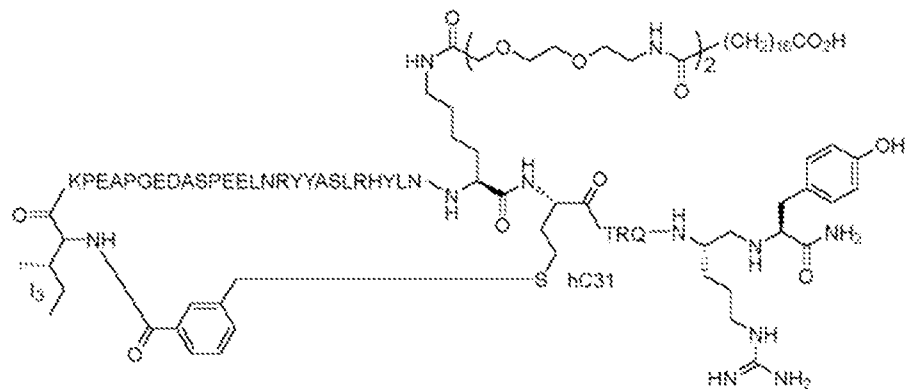


ES 3 025 907 T3

SEQ ID NO: 27

Nombre: [ciclo-(13 *m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-COC₁₆CO₂H)₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

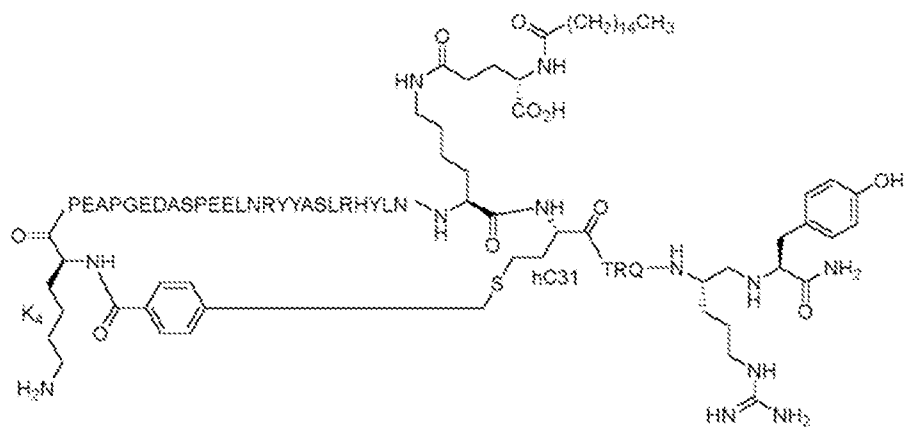
Estructura:



SEQ ID NO: 28

Nombre: [ciclo-(K4 *p*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35, Y36)]-PYY4-36

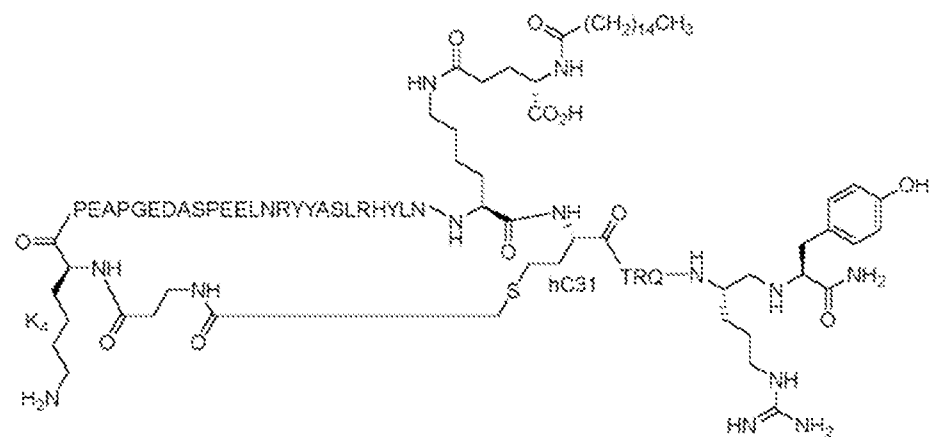
Estructura:



SEQ ID NO: 29

Nombre: [ciclo-(K4CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35, Y36)]-PYY4-36

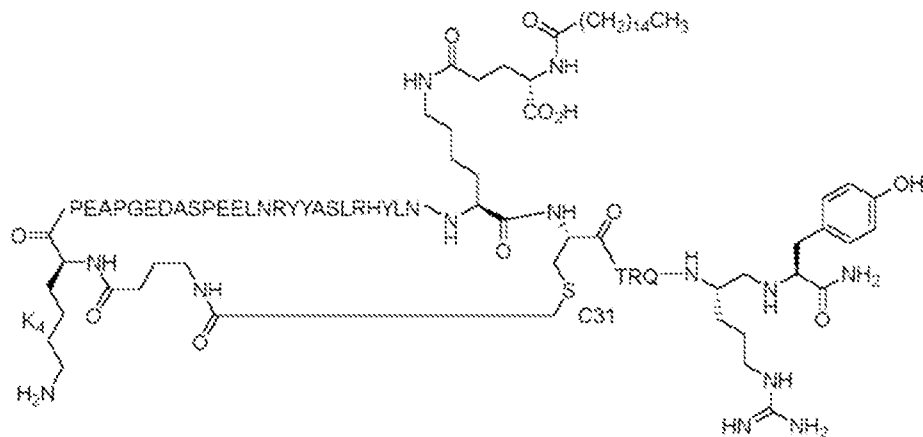
Estructura:



SEQ ID NO: 30

Nombre: [ciclo-(K4CO(CH₂)₃NHCOCH₂-C31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

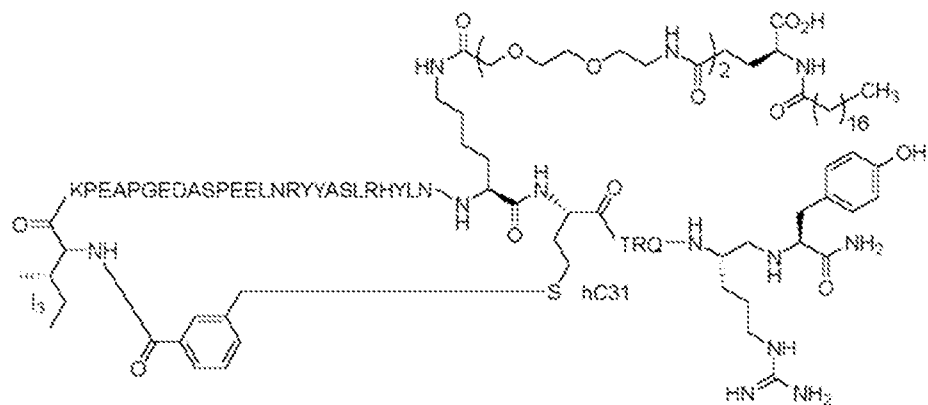
Estructura:



SEQ ID NO: 31

Nombre: [ciclo-(I3 *m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Stear)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

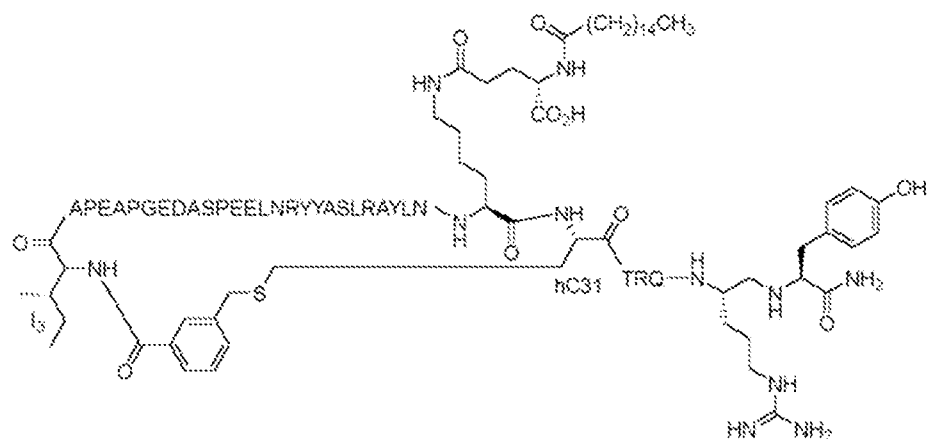
Estructura:



SEQ ID NO: 32

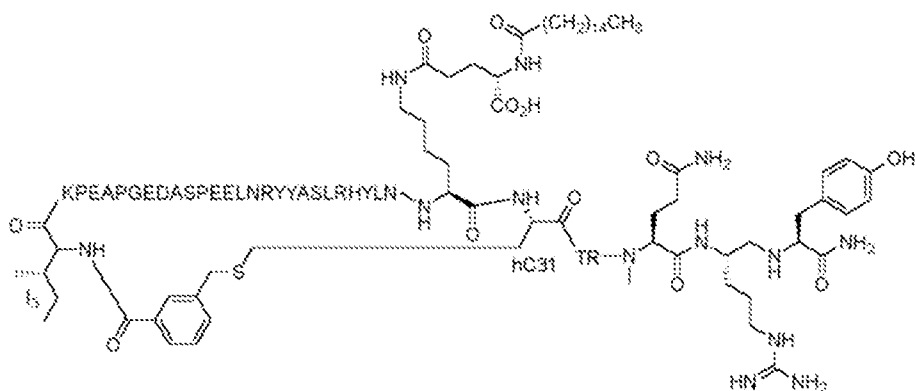
Nombre: [ciclo-(I3 *m*-COPhCH₂-hC31), A4, A26, K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Estructura:



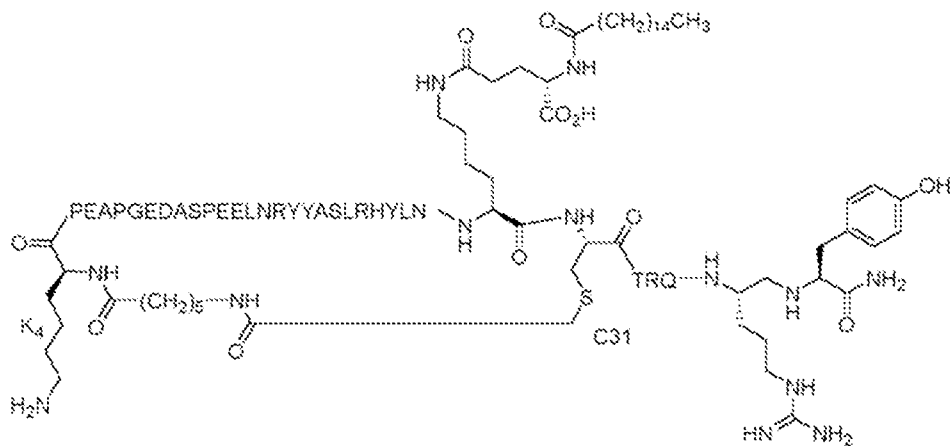
SEQ ID NO: 33

Nombre: [ciclo-(I3 *m*-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-Q34), psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 34

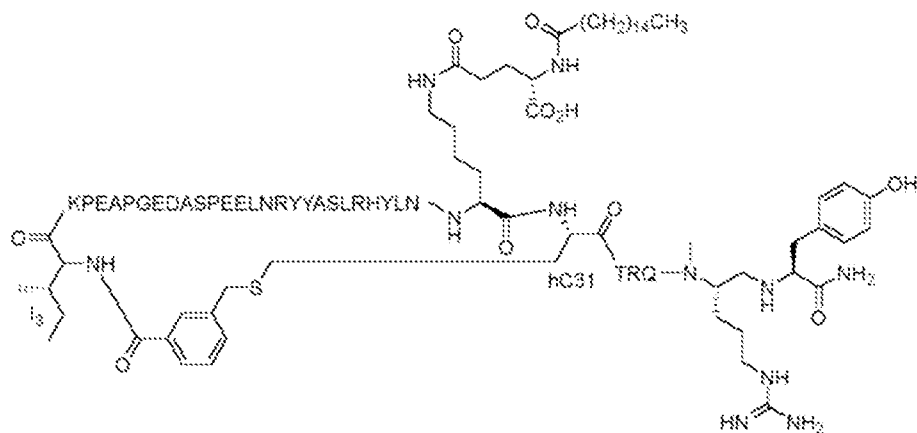
Nombre: [ciclo-(K4-CO(CH₂)₅NHCOCH₂-C31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36
Estructura:



SEQ ID NO: 35

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

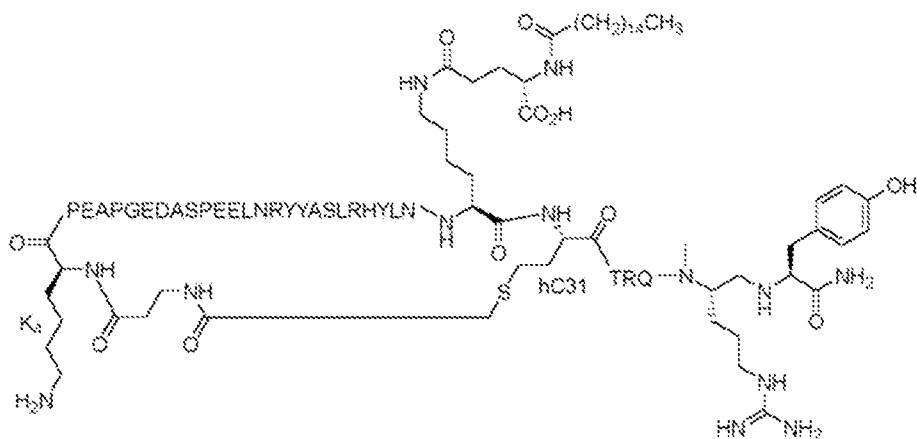
Estructura:



SEQ ID NO: 36

Nombre: [ciclo-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

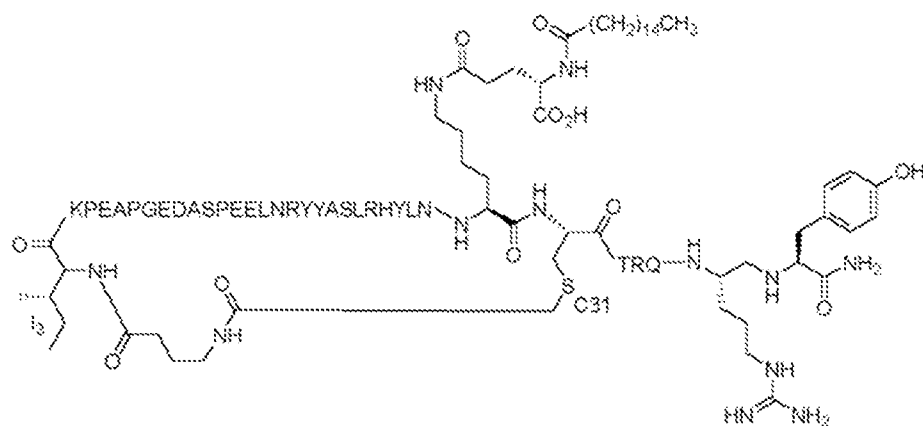
Estructura:



SEQ ID NO: 37

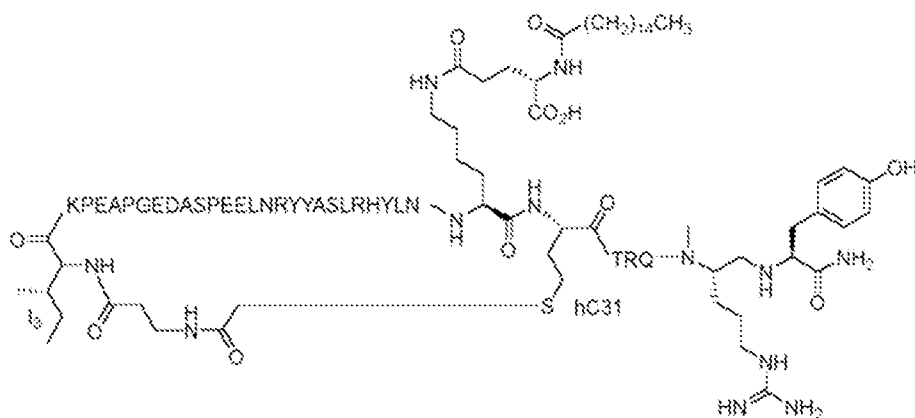
Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₃NHCOCH₂-C31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Estructura:



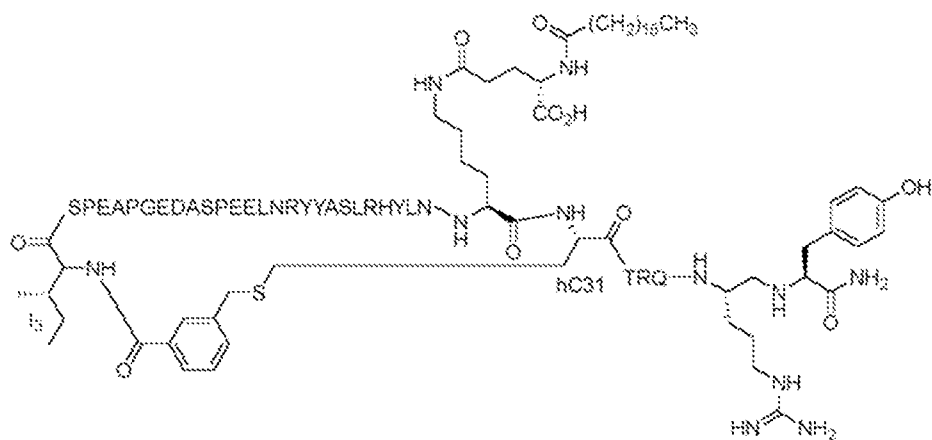
SEQ ID NO: 38

Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 39

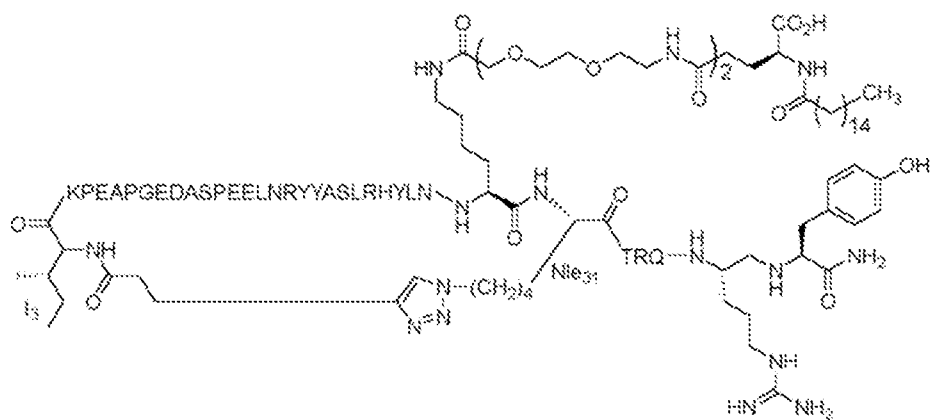
Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), S4, K(y-Glu-Arach)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 40

Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂triazolil-Nle31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

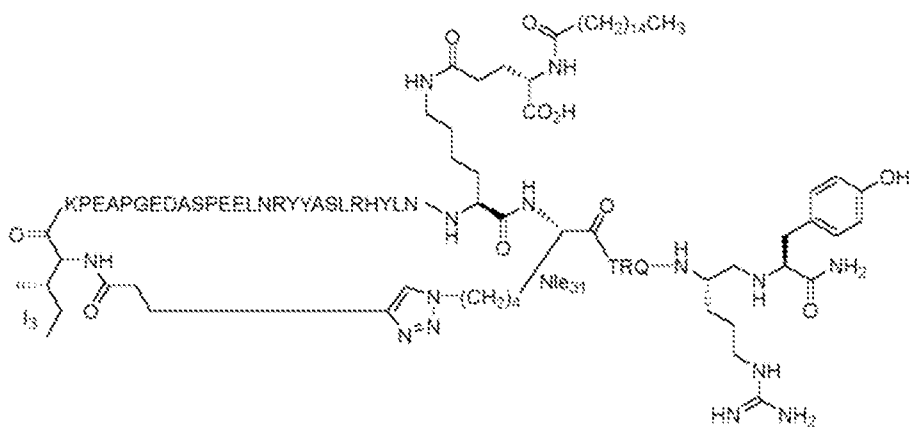
Estructura:



SEQ ID NO: 41

Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂triazolil-Nle₃₁), K(y-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

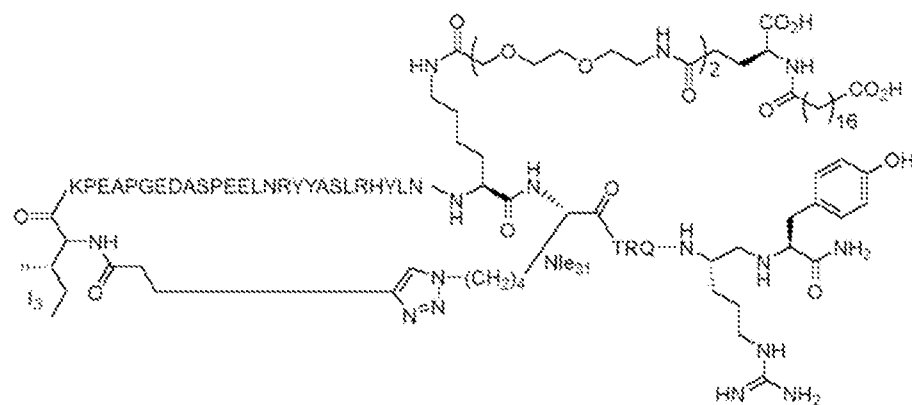
Estructura:



SEQ ID NO: 42

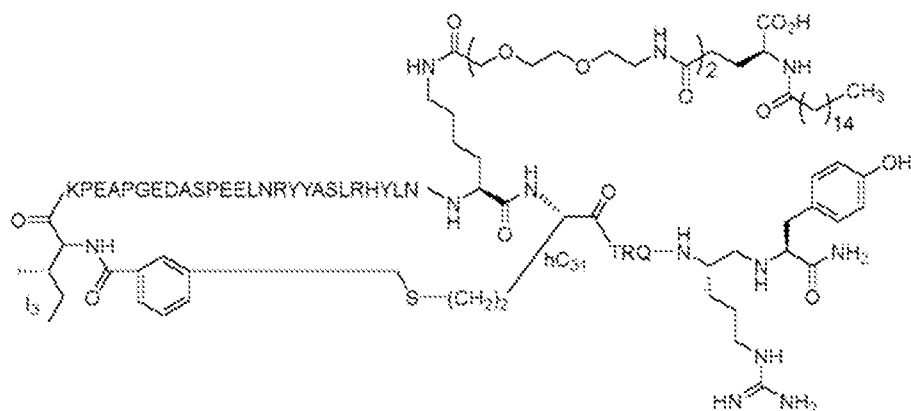
Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂triazolil-Nle₃₁), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Estructura:



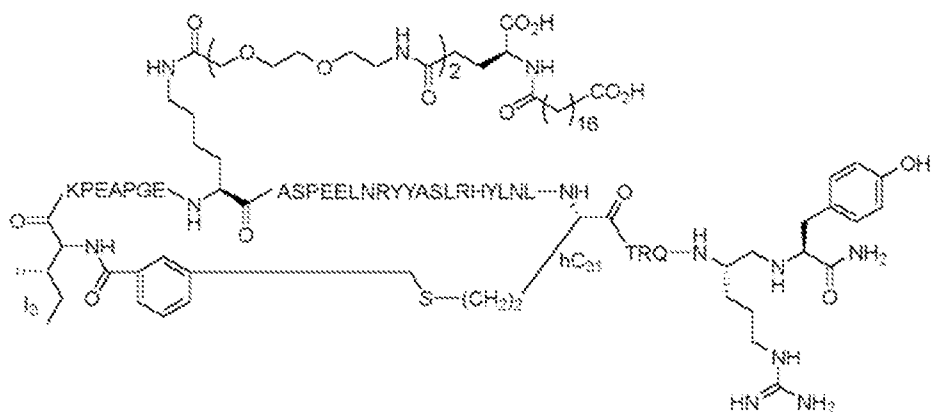
SEQ ID NO: 43

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



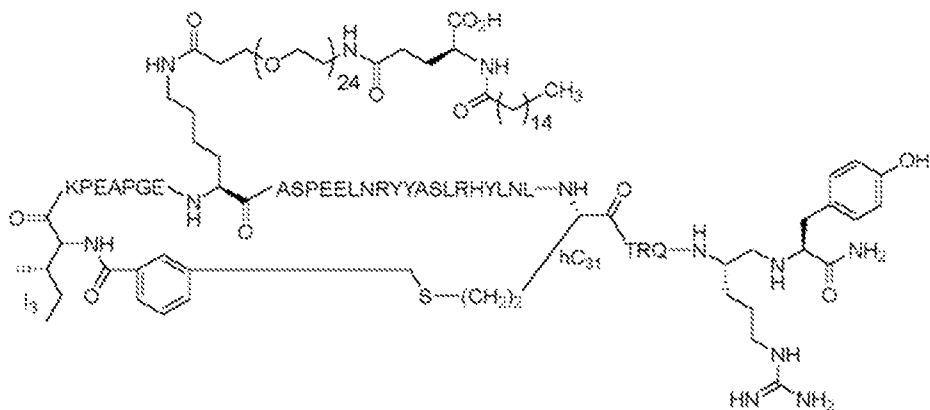
SEQ ID NO: 44

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu- COC₁₆CO₂H)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



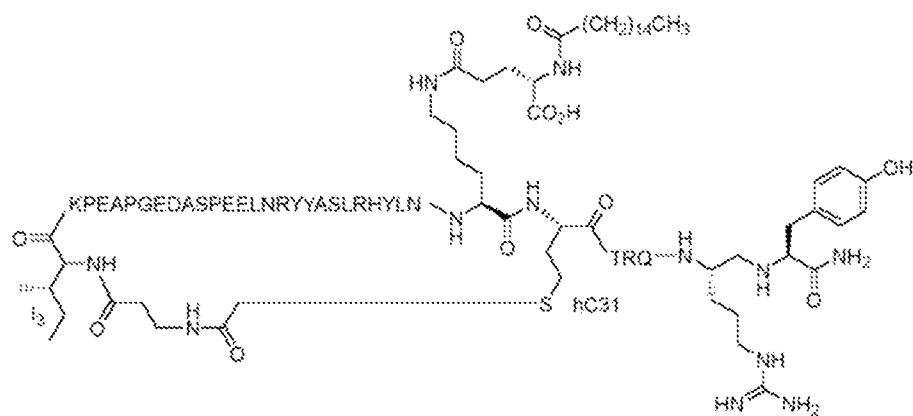
SEQ ID NO: 45

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₂₄NH-γ-Glu-Pal)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



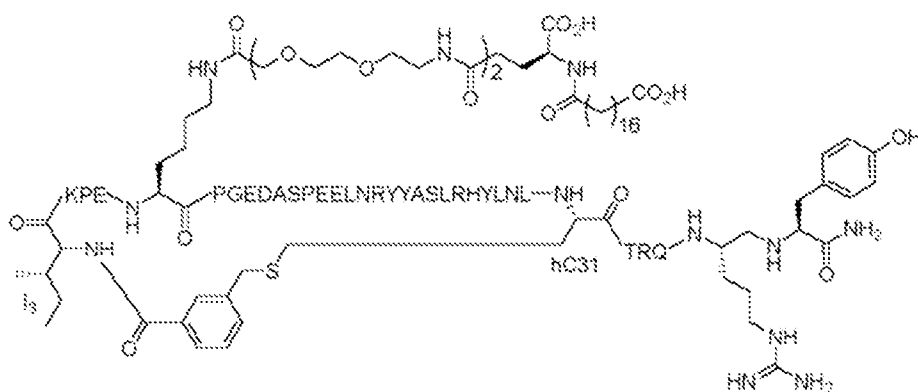
SEQ ID NO: 46

Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



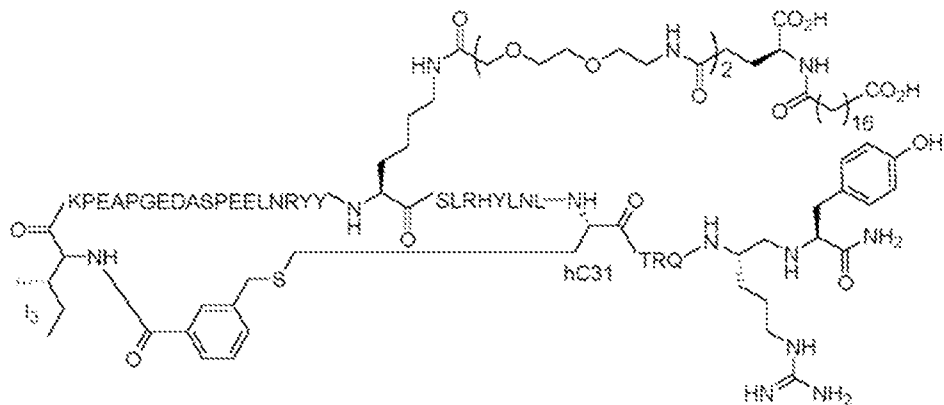
SEQ ID NO: 47

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H)7, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



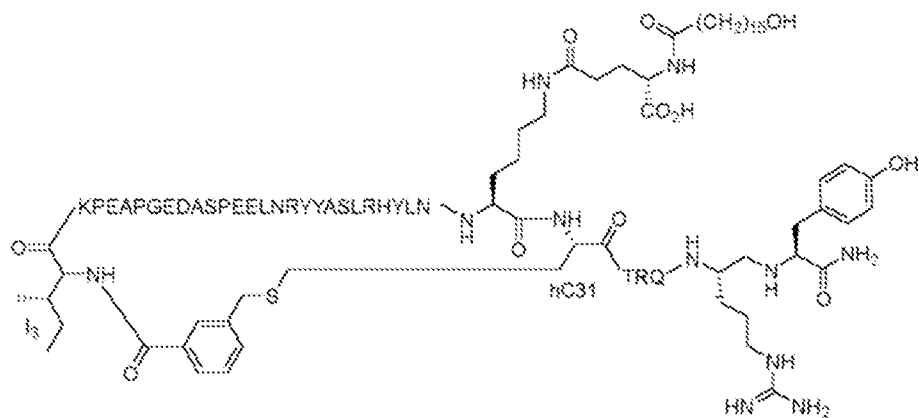
SEQ ID NO: 48

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H)₂, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



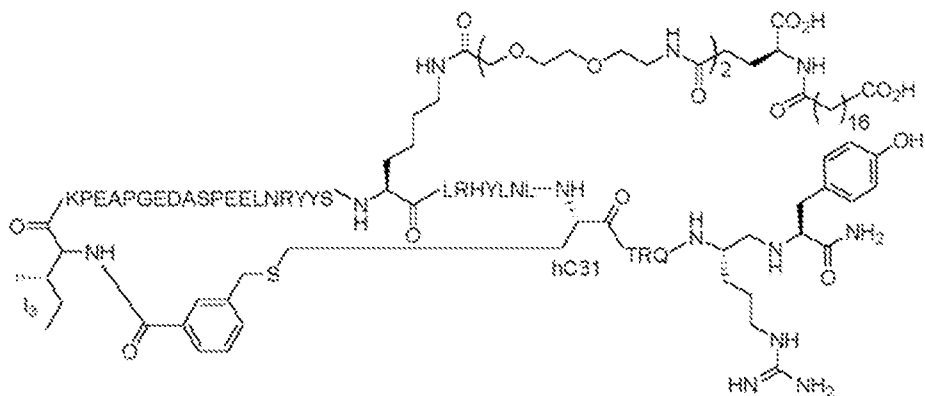
SEQ ID NO: 49

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(y-Glu-(Pal-16-OH))30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



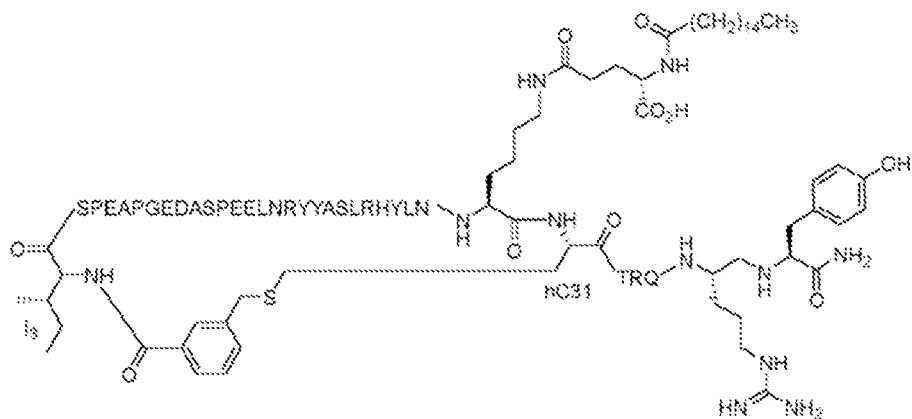
SEQ ID NO: 50

Nombre: [ciclo-(I3 m-COPhCH₂- hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H)₂3, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 51

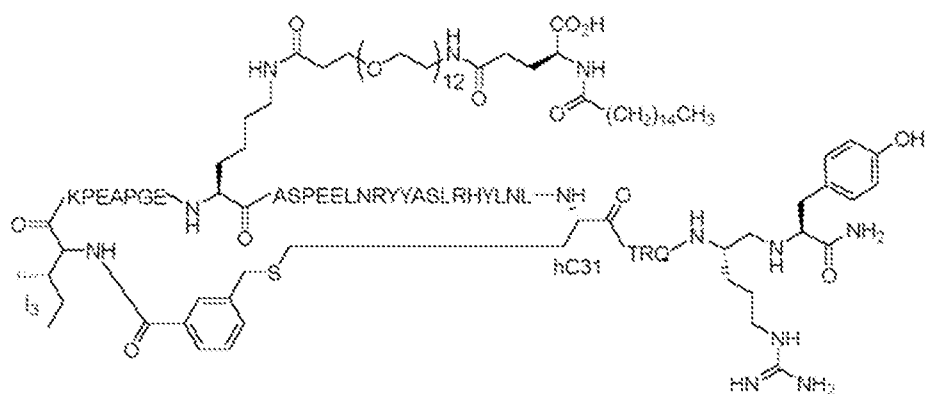
Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), S4, K(y-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 52

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₁₂NH-γ-Glu-Pal)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

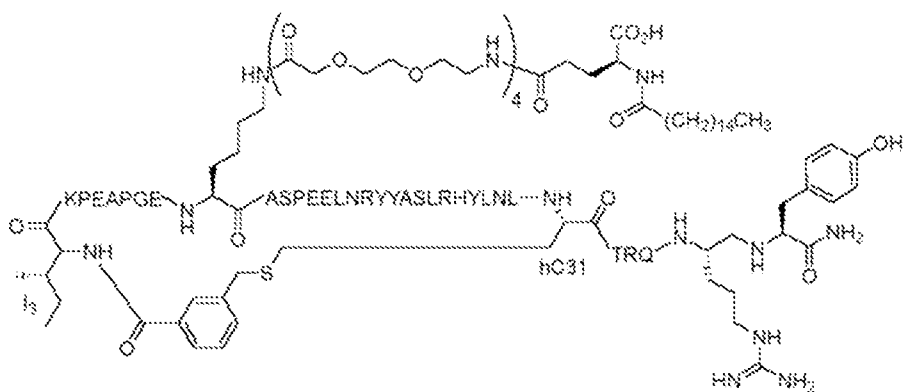
Estructura:



SEQ ID NO: 53

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₄-γ-Glu-Pal)₁₁, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

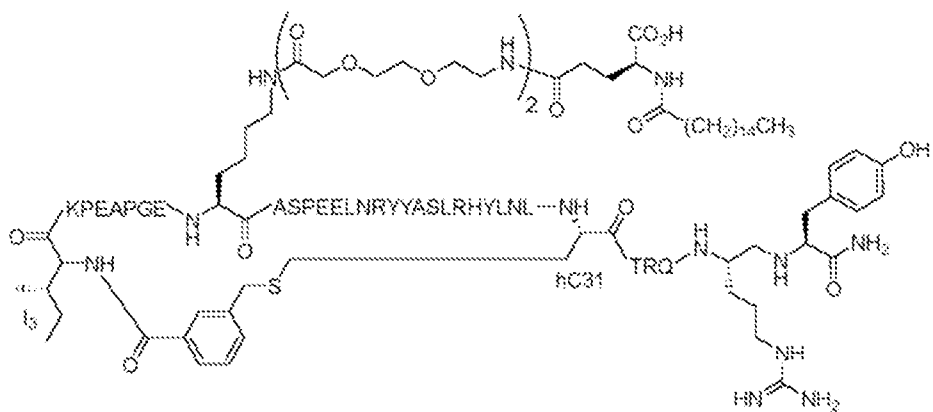
Estructura:



SEQ ID NO: 54

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₁₁, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

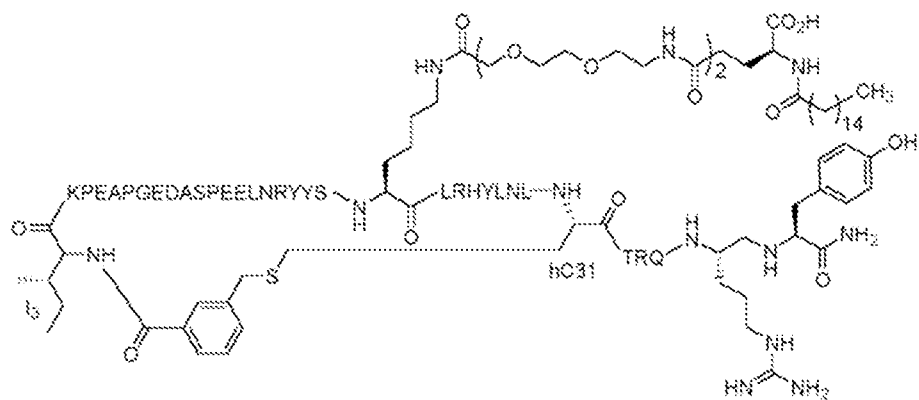
Estructura:



SEQ ID NO: 55

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₂₃, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

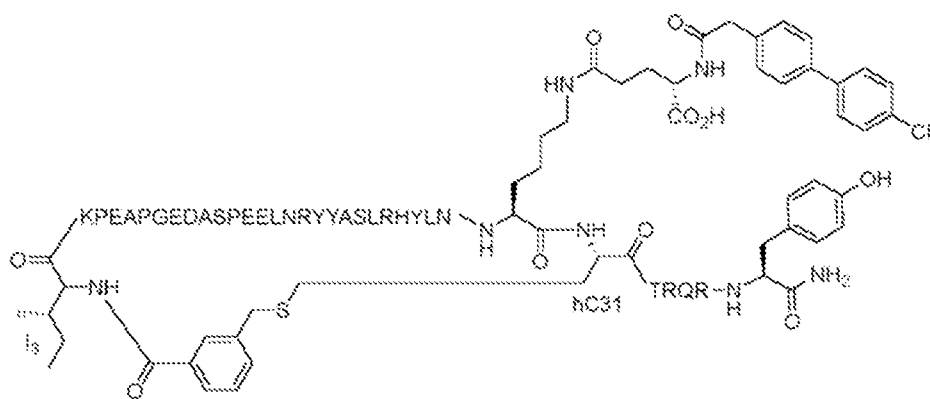
Estructura:



SEQ ID NO: 56

Nombre: [ciclo-(I3- *m*-COPhCH₂- hC31), K(γ-Glu-COCH₂Ph-(4-ClPh)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Estructura:



SEQ ID NO: 57

Nombre: [ciclo-(I3-*m*-COPhCH₂- hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₂PhO-(2,4-Cl₂Ph)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Estructura:

10

15

20

25

30

35

40

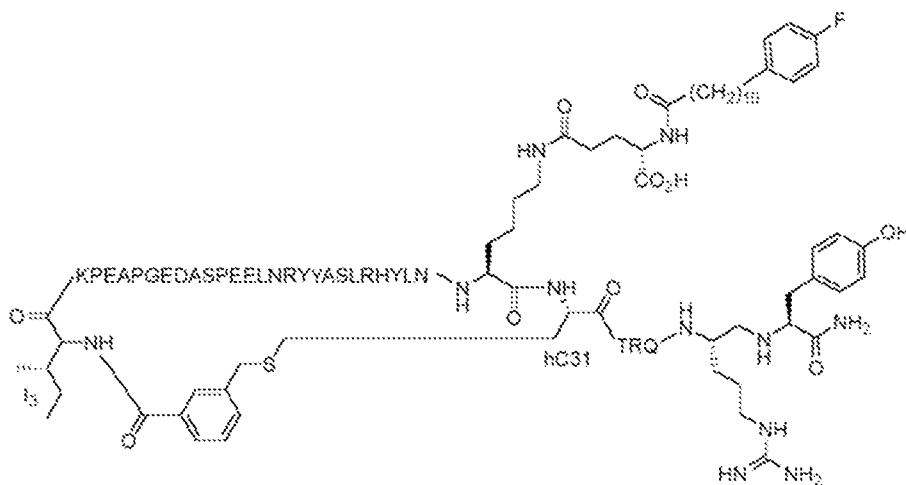
45

50

55

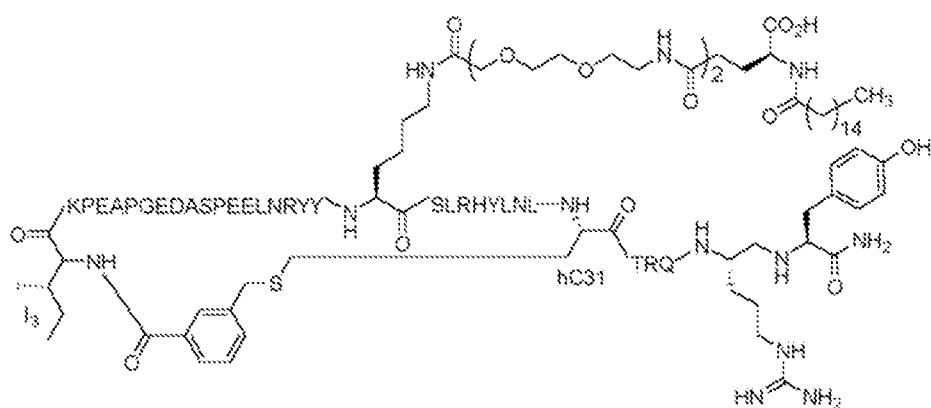
60

65



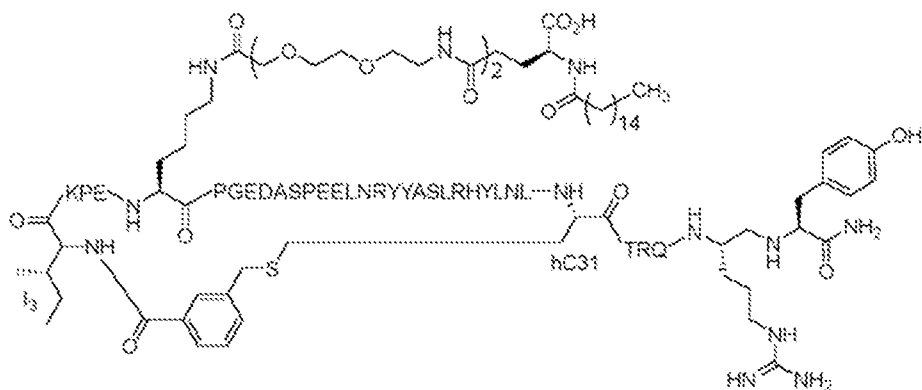
50

Estructura:



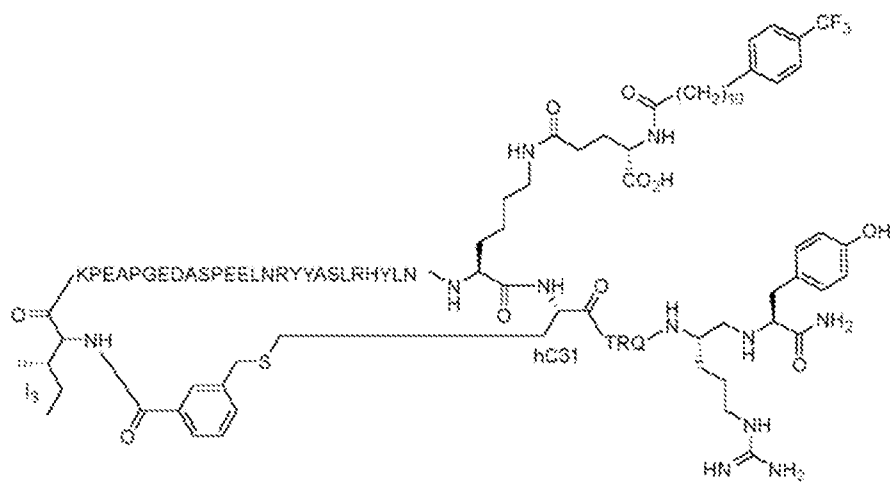
SEQ ID NO: 60

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₇, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



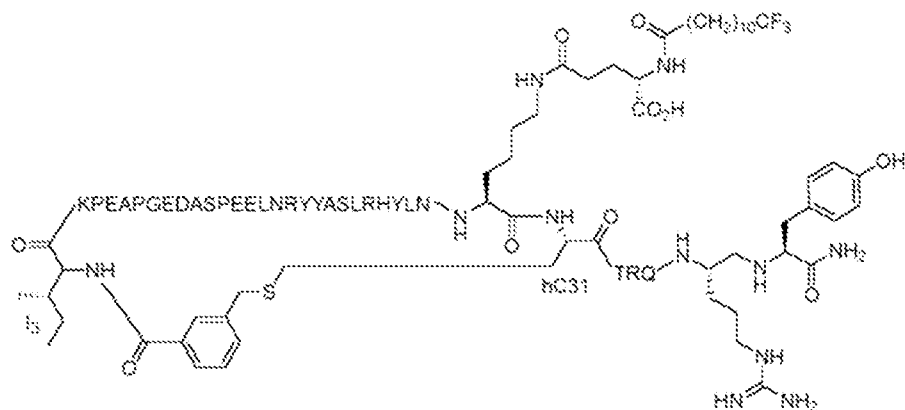
SEQ ID NO: 61

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(4-F3C-Ph))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



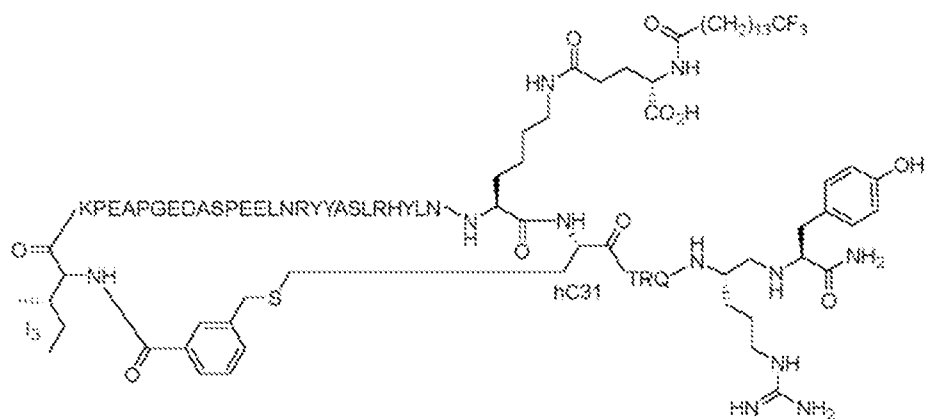
SEQ ID NO: 62

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-CF₃)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



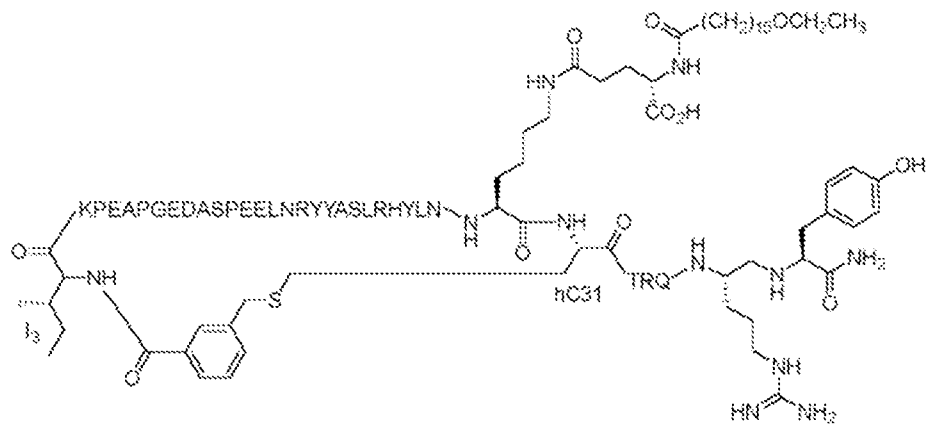
SEQ ID NO: 63

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₃-CF₃)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



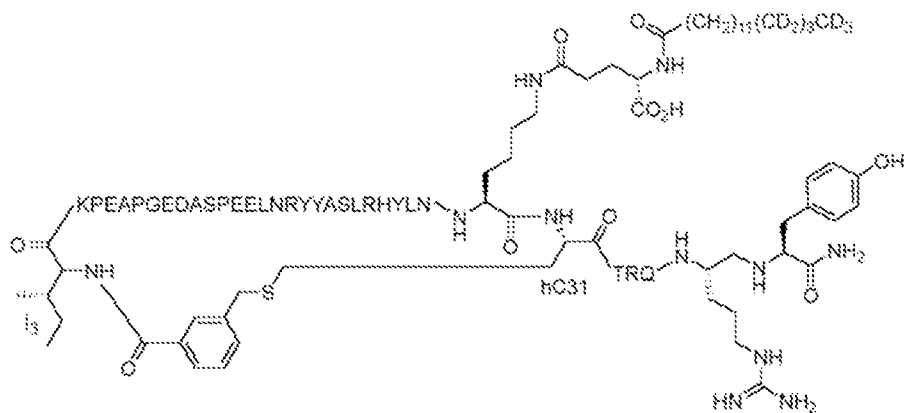
SEQ ID NO: 64

Nombre: [ciclo-(13-*m*-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-(Pal-16-OEt))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



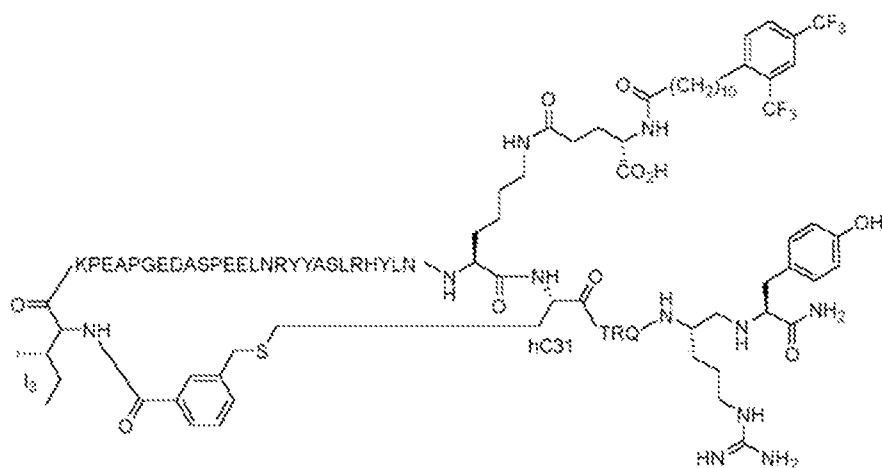
SEQ ID NO: 65

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₁(CD₂)₃CD₃)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



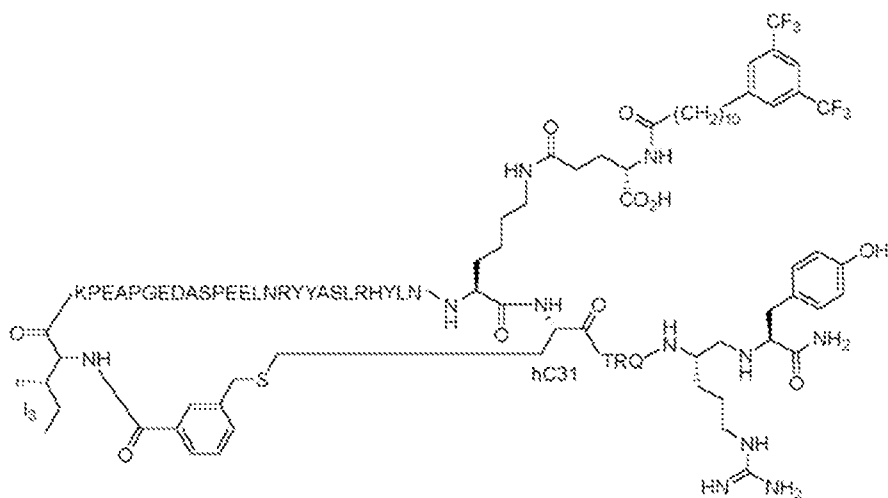
SEQ ID NO: 66

Nombre: [ciclo-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(2,4-(CF₃)₂-Ph))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 67

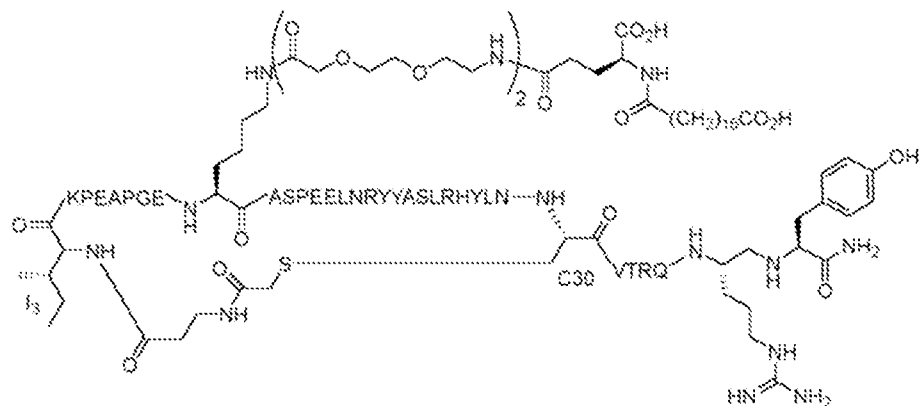
Nombre: [ciclo-(I3 m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(3,5-(CF₃)₂-Ph))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



ES 3 025 907 T3

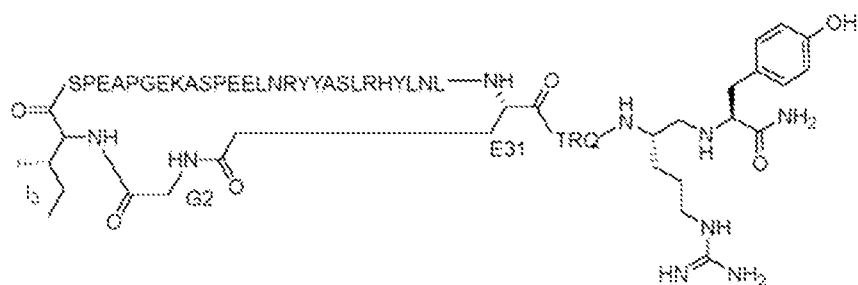
SEQ ID NO: 68

Nombre: [ciclo-(I3-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-C30), K((OEG)₂-γ-Glu- COC₁₆CO₂H)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



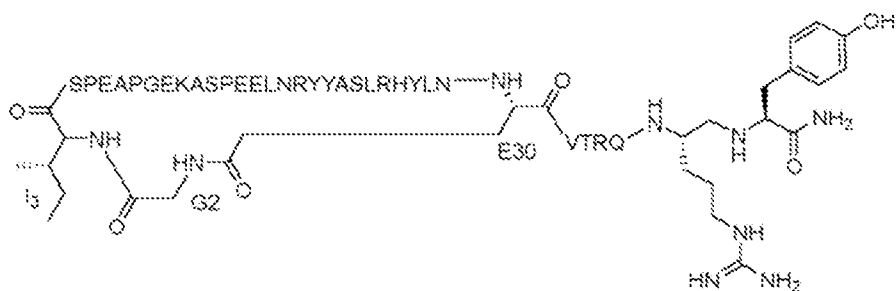
SEQ ID NO: 69

Nombre: [ciclo-(G2-E31), S4, K11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



SEQ ID NO: 70

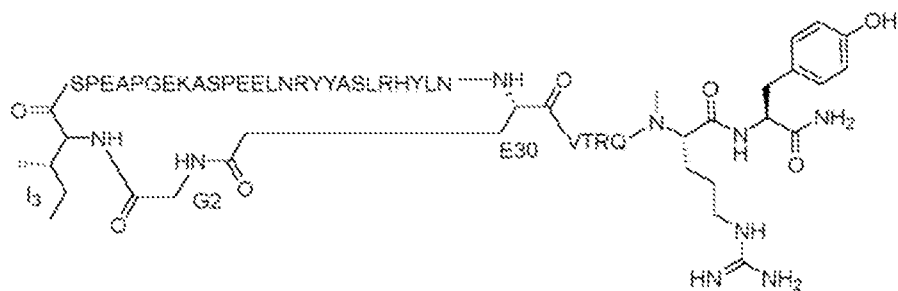
Nombre: [ciclo-(G2-E30), S4, K11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



SEQ ID NO: 71

Nombre: [ciclo-(G2-E30), S4, K11, (N-Me-R35)]-PYY3-36

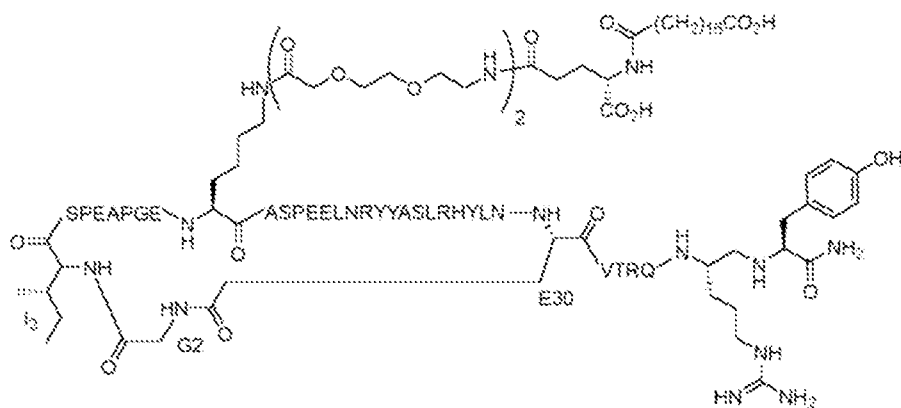
Estructura:



SEQ ID NO: 72

Nombre: [ciclo-(G2-E30), S4, K((OEG)₂-γ-Glu- COC₁₆CO₂H)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

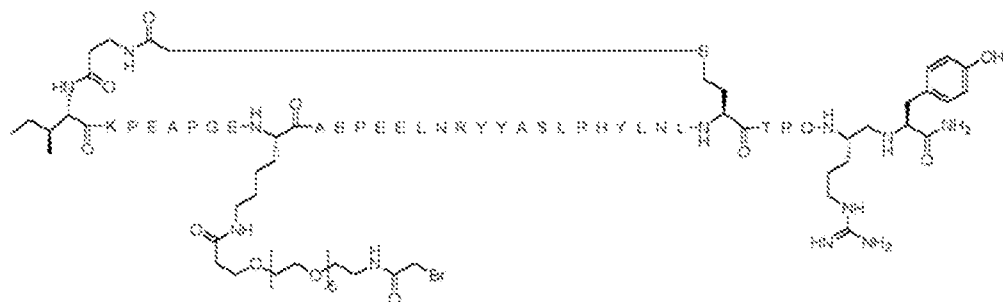
Estructura:



SEQ ID NO: 73

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG6-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

Estructura:



SEQ ID NO: 74

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

Estructura:

10

15

Estructura:

20

25

30

Estructura:

40

45

50

Estructura:

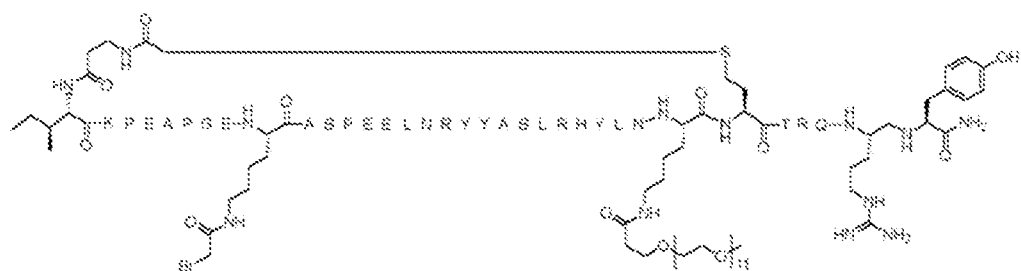
55

60

65

5

10

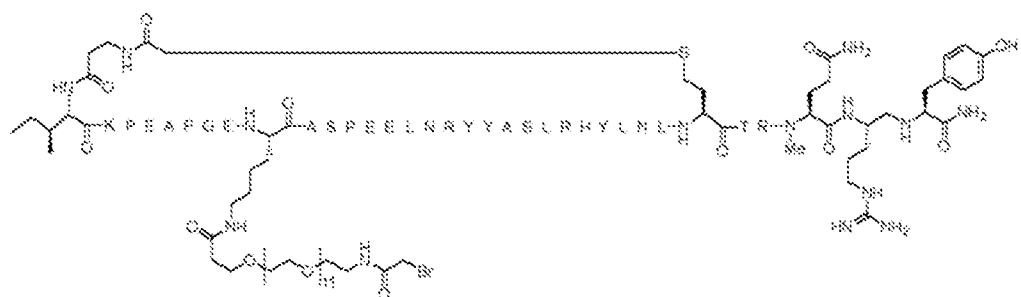


15
 SEQ ID NO: 78 Nombre:
 [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, (N-Me)Q34, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
 Estructura:

20

25

30

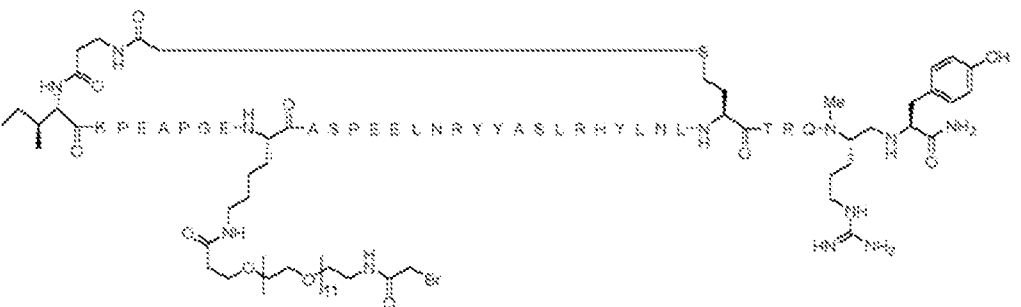


SEQ ID NO: 79

35
 Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35, *psi*-(R35,36Y)]-PYY2-36
 Estructura:

40

45



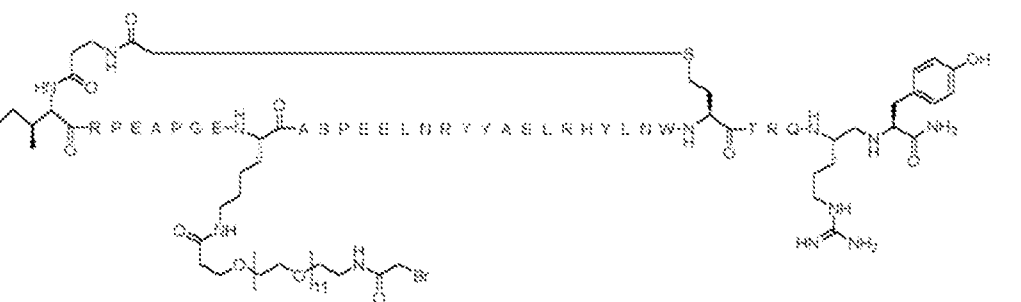
50
 SEQ ID NO: 80

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
 Estructura:

55

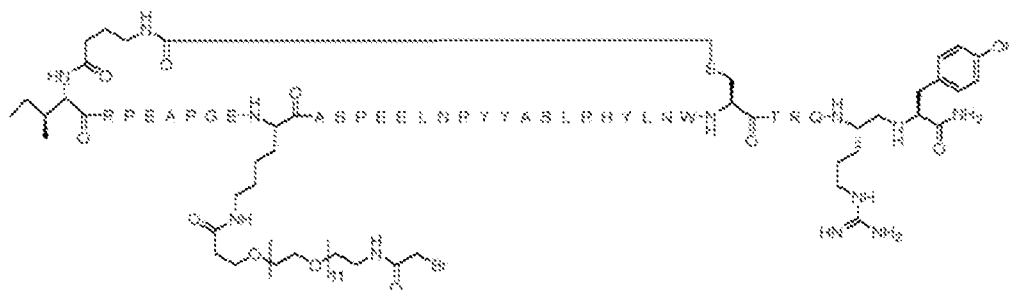
60

65



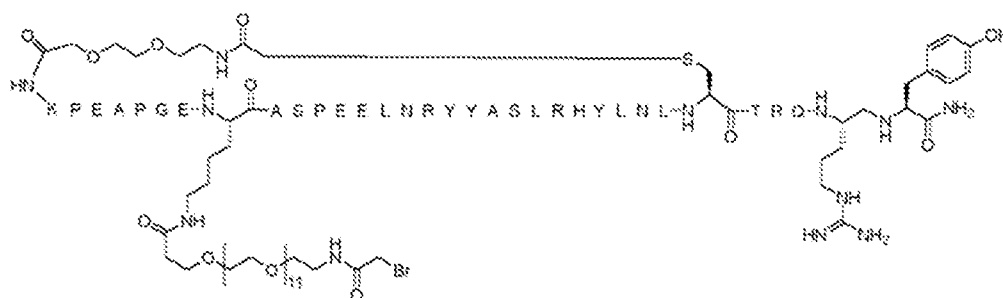
SEQ ID NO: 81

Nombre: [Ciclo-(3I-COCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂-C31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



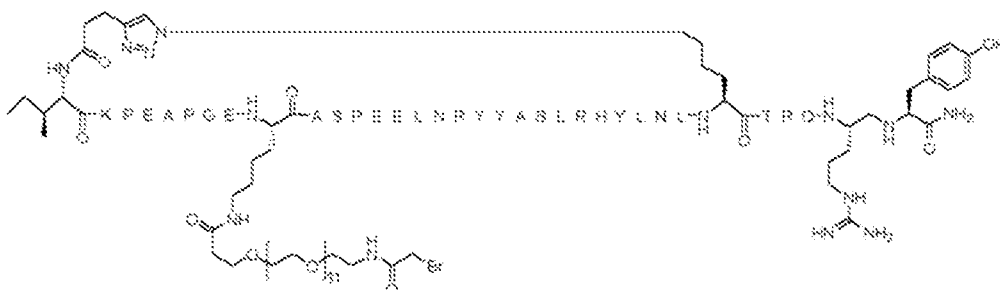
SEQ ID NO: 82

Nombre: [Ciclo-(K4-OEG-COCH₂-C31), K(PEG12-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY4-36
Estructura:



SEQ ID NO: 83

Nombre: [Ciclo-(I3-COCH₂CH₂triazolilNle31), K(PEG12-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:



SEQ ID NO: 84

Nombre: [Ciclo-(I3-*m*-CO-bencil-hC31), K(PEG8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36
Estructura:

5

10

15

SEQ ID NO: 85

20

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)₂₃, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36,
Estructura:

25

30

35

SEQ ID NO: 86

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)₂₂, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:

40

45

50

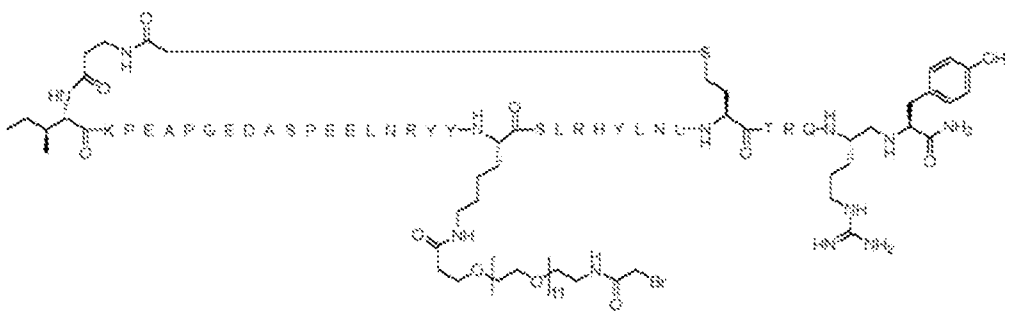
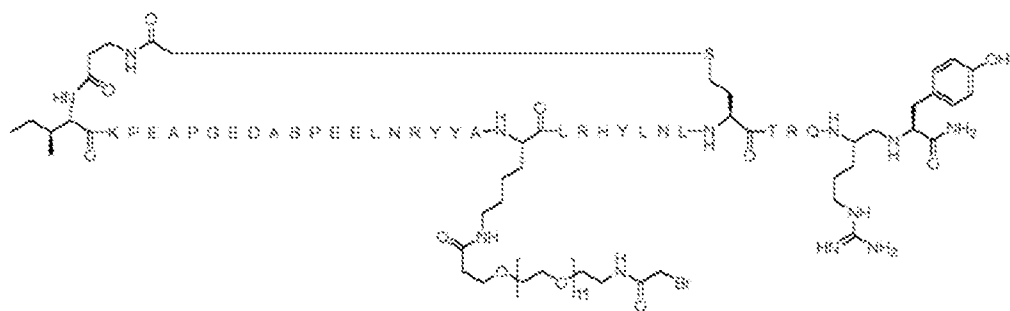
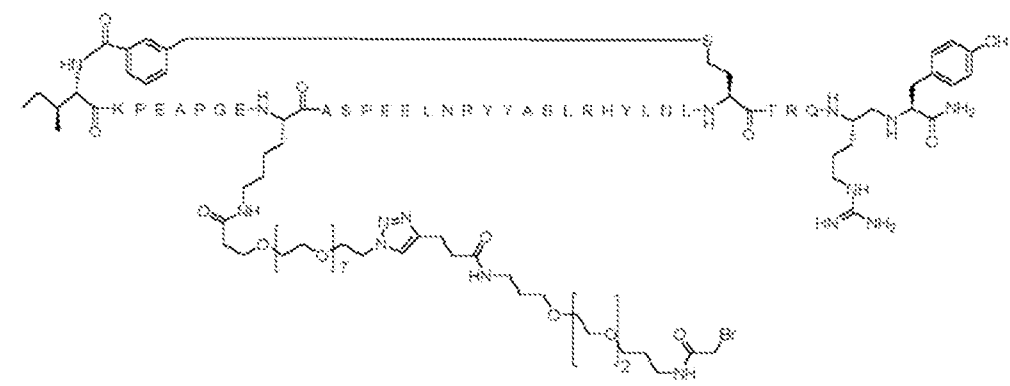
SEQ ID NO: 87

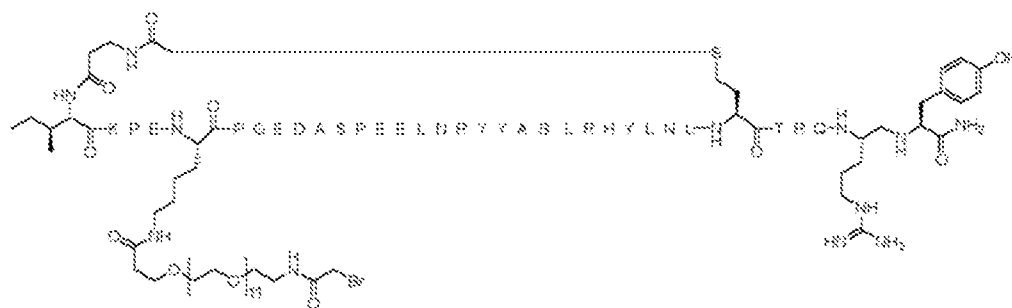
55

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)₇, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:

60

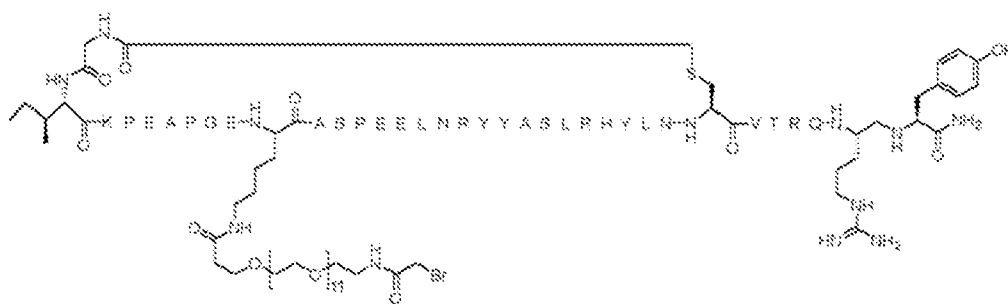
65





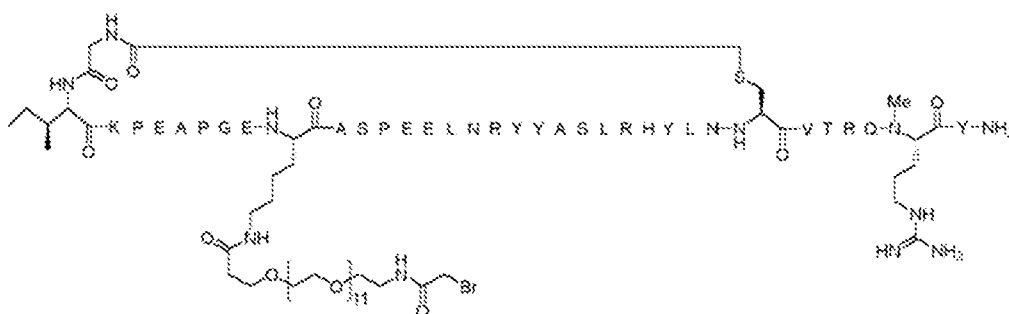
SEQ ID NO: 88

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



SEQ ID NO: 89

Nombre: [Ciclo-(G2COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



SEQ ID NO: 90

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



10

15 SEQ ID NO: 91

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

Estructura:



30

SEQ ID NO: 92

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]PYY2-36

Estructura:



45

50

SEQ ID NO: 93

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

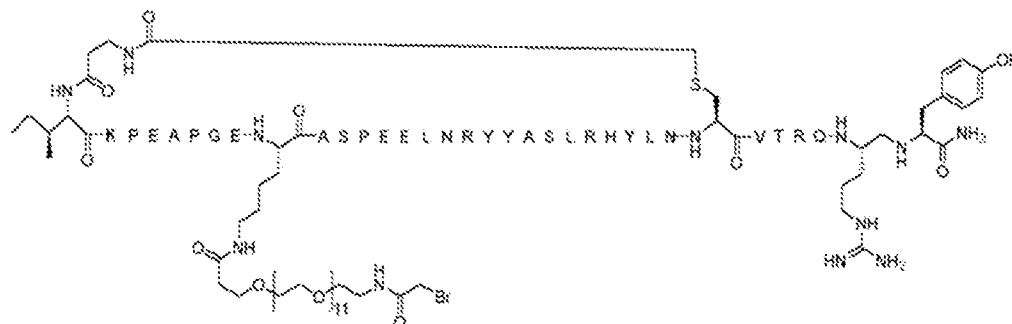
Estructura:



65

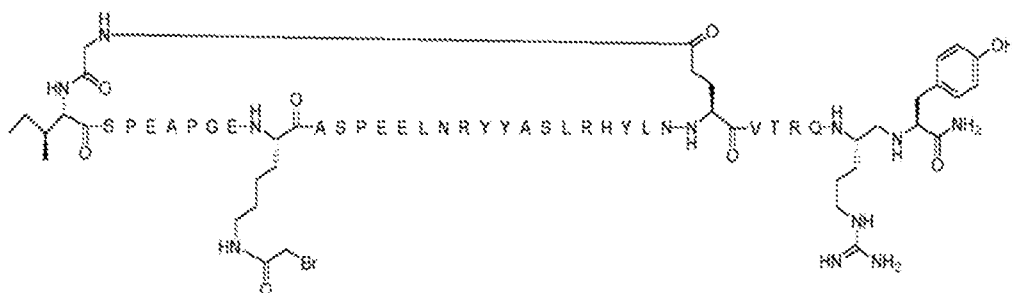
SEQ ID NO: 94

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-C30), K(PEG12AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



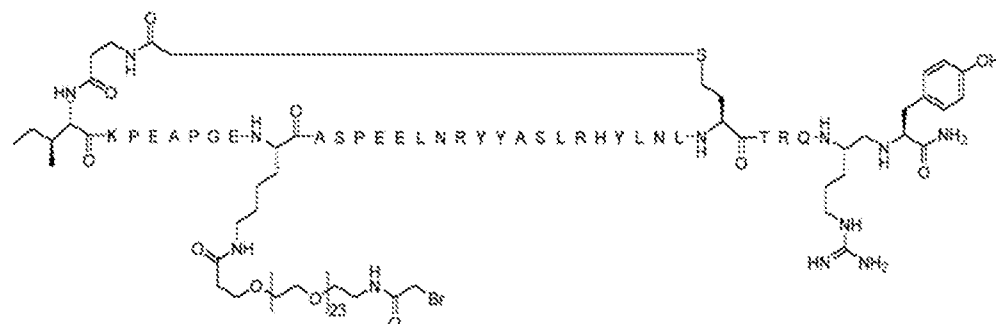
SEQ ID NO: 95

Nombre: [Ciclo-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



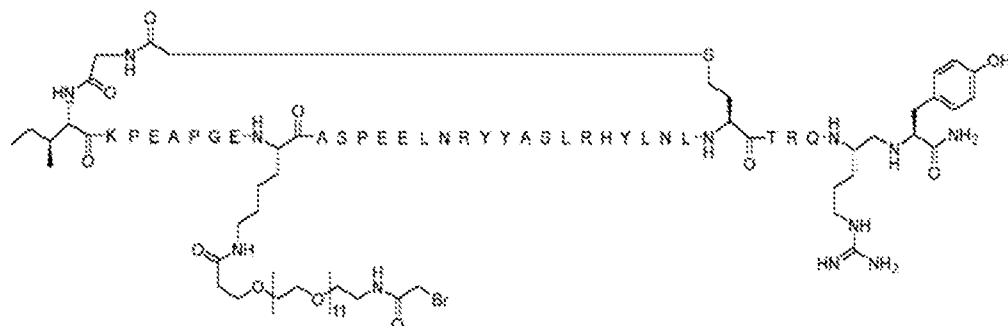
SEQ ID NO: 96

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG24-AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



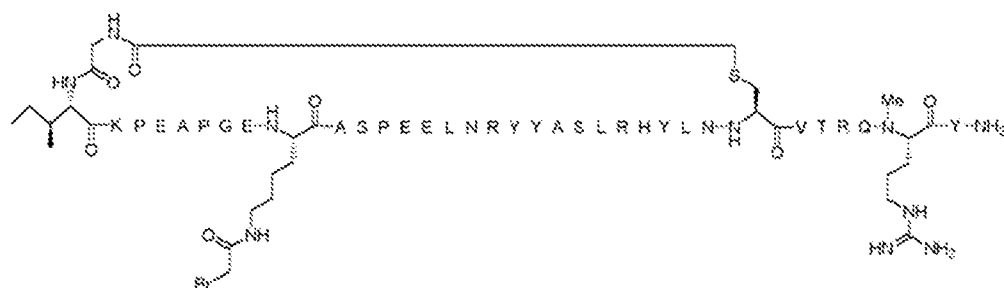
SEQ ID NO: 97

Nombre: [Ciclo-(G2-Ac-hC31), K(PEG12-AcBr)11, *psi*-(R35-Y3 6)]-PYY2-36
Estructura:



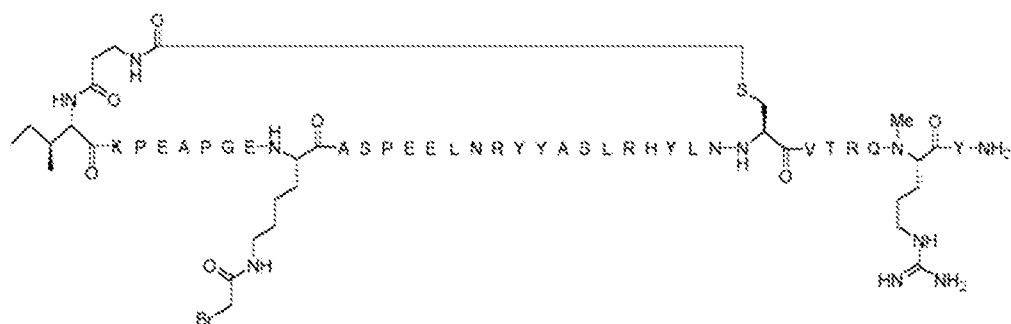
15 SEQ ID NO: 98

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



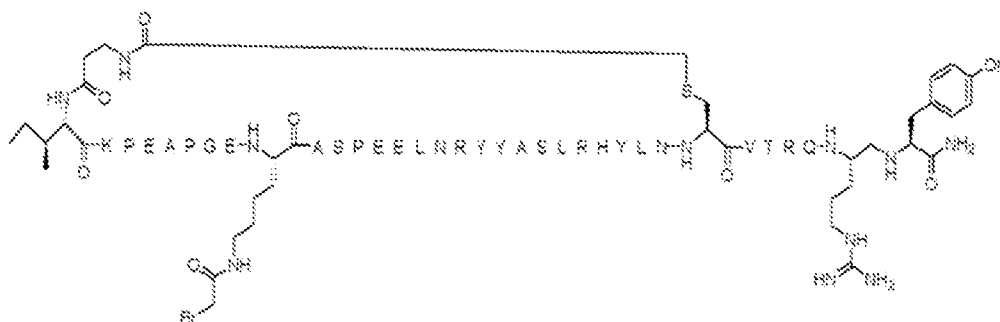
35 SEQ ID NO: 99

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:

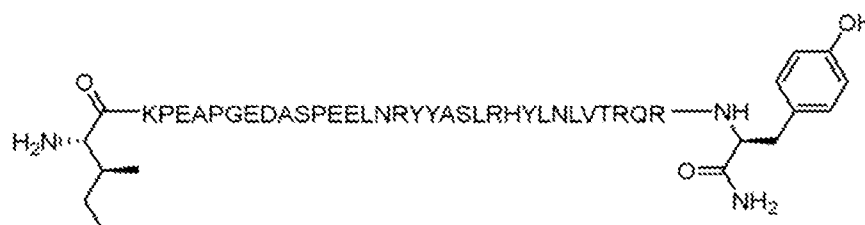


50 SEQ ID NO: 100

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:

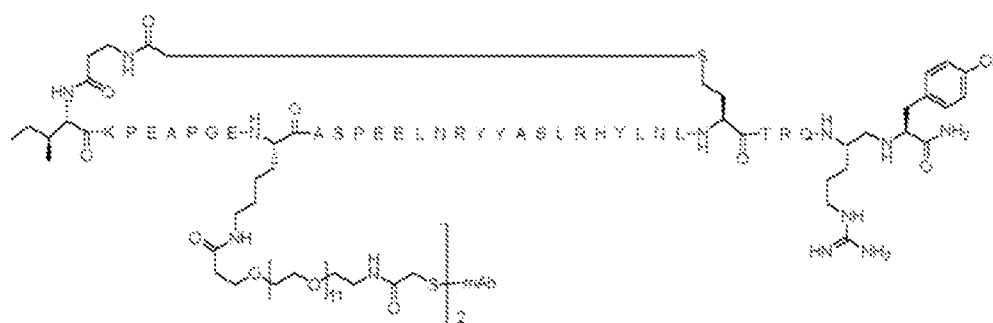


SEQ ID NO: 101 hPYY3-36
Estructura:



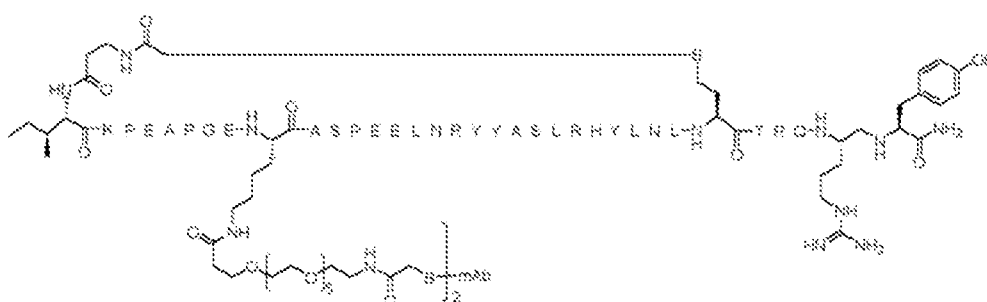
SEQ ID NO: 102

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, *psi*-(35R,36Y)]-PYY2-36 Conjugado de homodímero de mAb
(Compuesto 1)
Estructura:



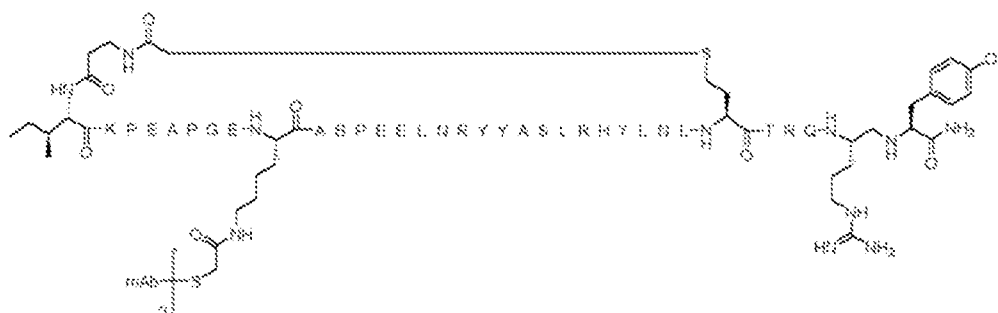
SEQ ID NO: 103

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG6)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 2)
Estructura:



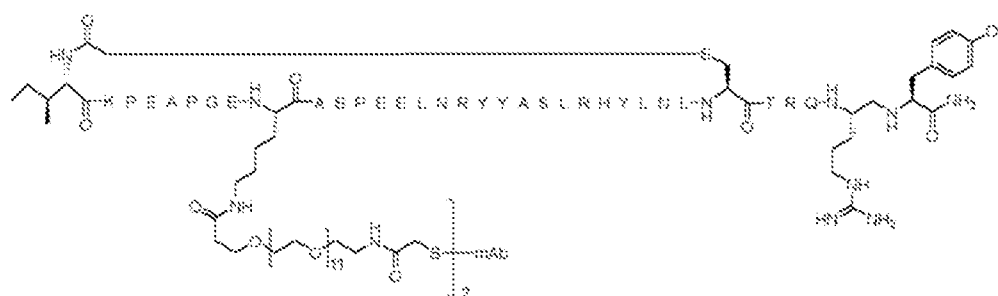
SEQ ID NO: 104

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 3)
Estructura:



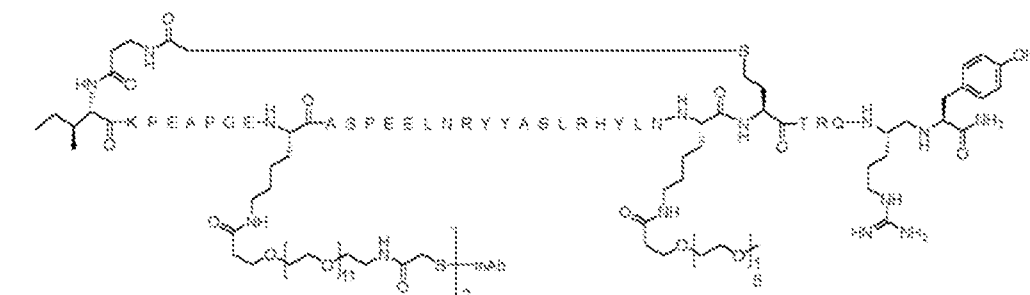
SEQ ID NO: 105

Nombre: [Ciclo-(I3COCH₂-C31), K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 4)
Estructura:



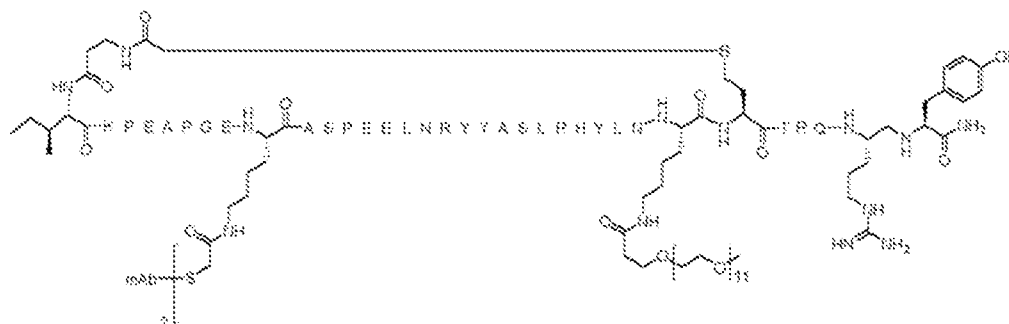
SEQ ID NO: 106

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, K(mPEG16)30, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 5)
Estructura:



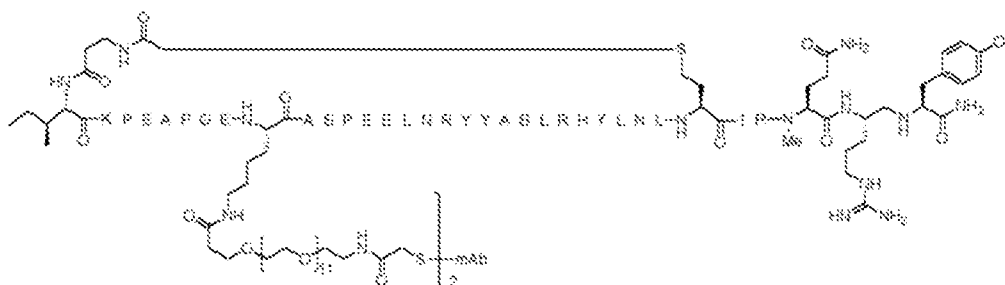
SEQ ID NO: 107

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K11, K(mPEG12)₂₀, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 6)
Estructura:



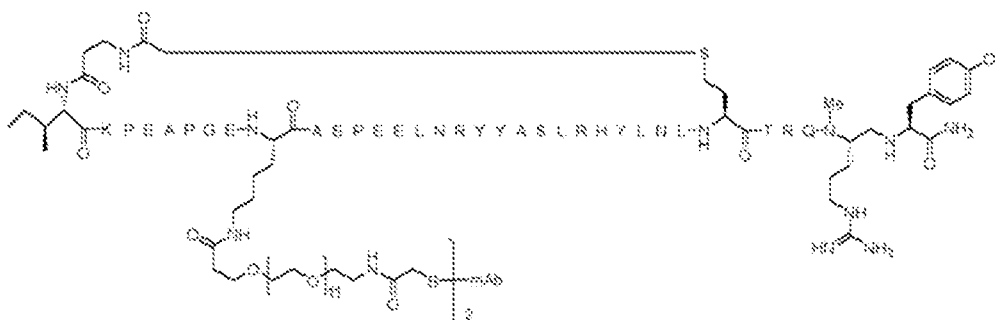
SEQ ID NO: 108

Nombre: [Ciclo-(β A2COCH₂-hC31), K(PEG12)11, (N-Me)Q34, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 conjugado de homodímero de mAb (compuesto 7)
Estructura:



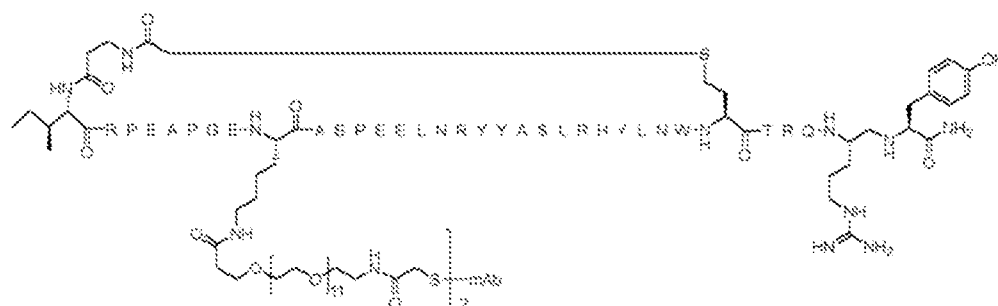
SEQ ID NO: 109

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, Conjugado de homodímero de mAb N-Me-R35, *psi*-(R35,36Y)]-PYY2-36 (Compuesto 8)
Estructura:



SEQ ID NO: 110

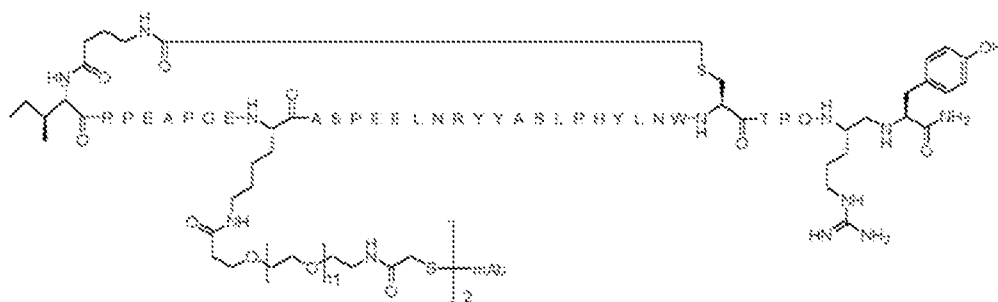
Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), R4, K(PEG12)11, W30, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 9)
Estructura:



SEQ ID NO: 111

Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(3ICOCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂-C31), R4, K(PEG12)11, W30, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36 (Compuesto 10)

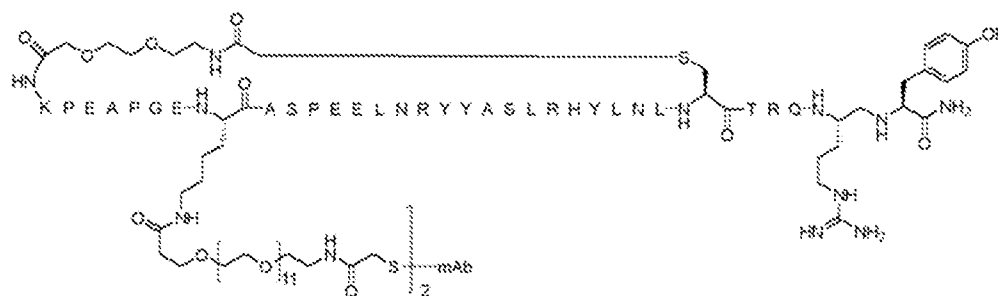
Estructura:



SEQ ID NO: 112

Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(K4-OEG-COCH₂-C31), Conjugado homodímero de mAb K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY4-36 (Compuesto 11)

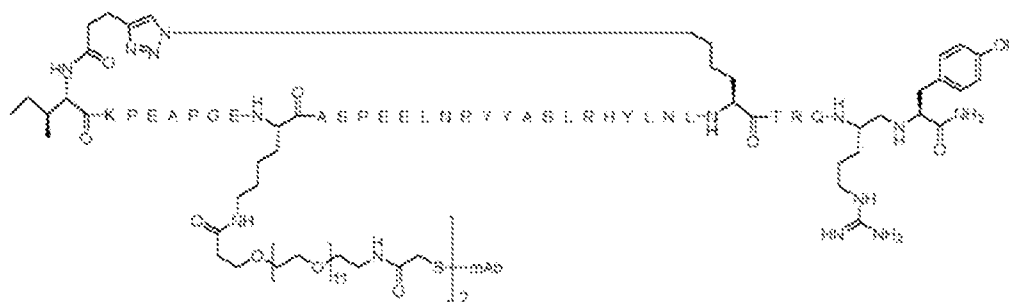
Estructura:



SEQ ID NO: 113

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [Ciclo-(I3-COCH₂CH₂triazolilNle31), K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36 (Compuesto 12)

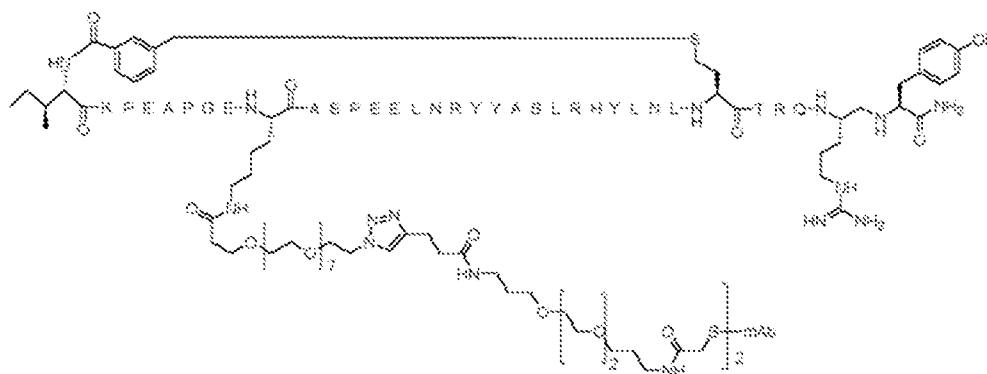
Estructura:



15 SEQ ID NO: 114

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [Ciclo-(I3-m-CO-bencil-hC31), K(PEG8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4)₁₁, *psi*-(R35,Y36)]-PYY3-36 (Compuesto 13)

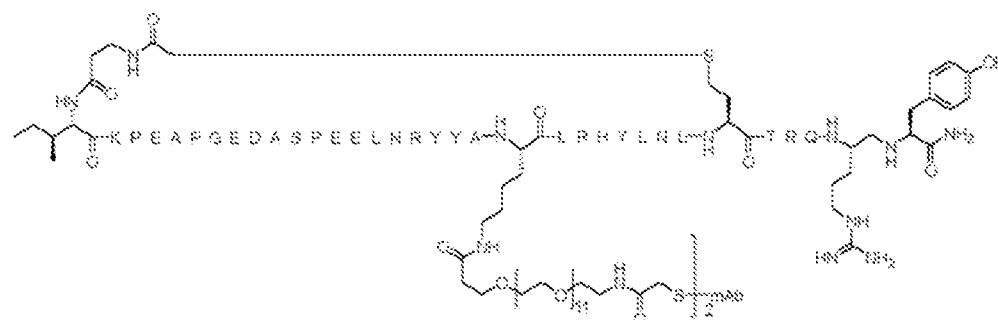
Estructura:



35 SEQ ID NO: 115

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [Ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), Conjugado homodímero de mAb K(PEG12)₂₃, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 14)

Estructura:



55 SEQ ID NO: 116

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [Ciclo-(βA2COCH₂-hC31), K(PEG12)₂₂, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 15)

Estructura:

5

10

SEQ ID NO: 117

15

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [Ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)7, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 16)

Estructura:

20

25

30

SEQ ID NO: 118

35

Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 17)

Estructura:

40

45

50

SEQ ID NO: 119

55

60

65

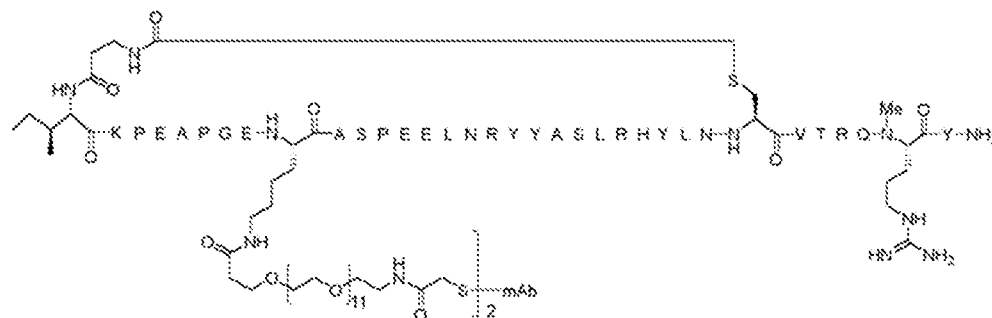
Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12)11, N-MeR35]-PYY2-36 (Compuesto 18)

Estructura:

SEQ ID NO: 120

Nombre: Conjugado de homodímero de mAb [Ciclo-(βA2COCH₂-C30), K(PEG12)11, N-Me-R35]-PYY2-36 (Compuesto 19)

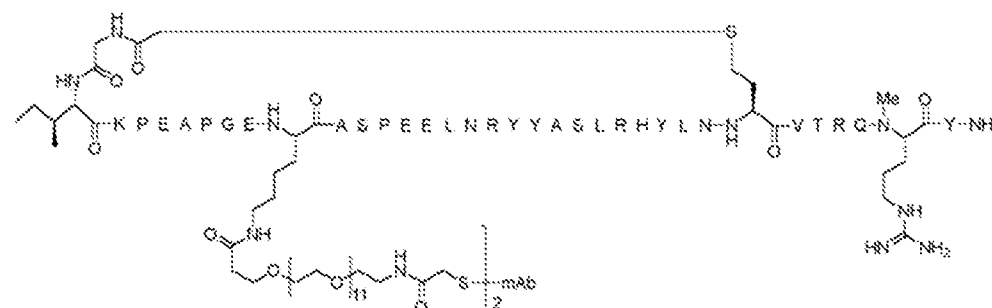
Estructura:



SEQ ID NO: 121

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12)11, N-Me-R35]-PYY2-36 (Compuesto 20)

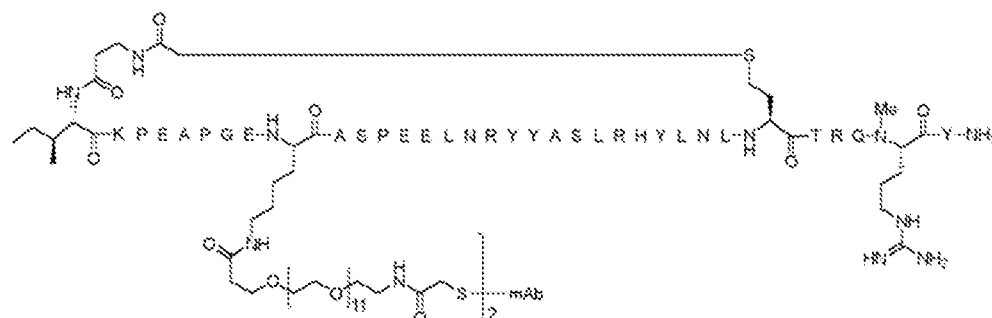
Estructura:



SEQ ID NO: 122

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, N-Me-R35]-PYY2-36 (Compuesto 21)

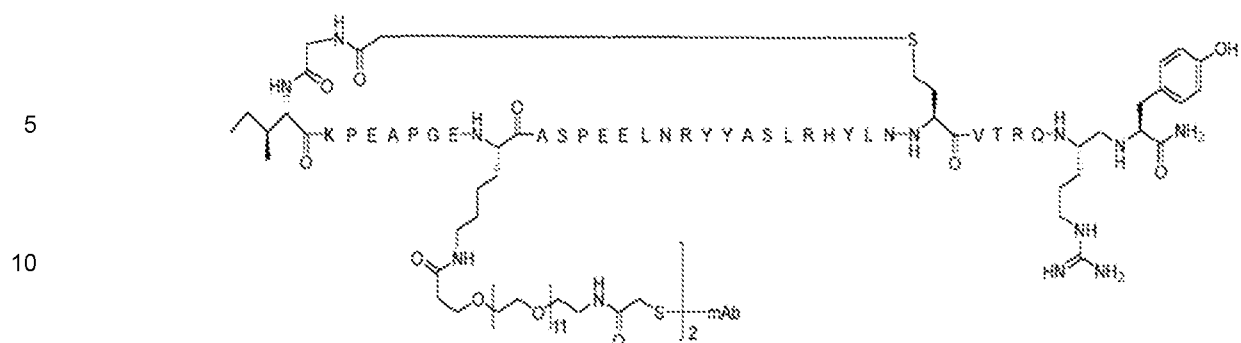
Estructura:



SEQ ID NO: 123

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 22)

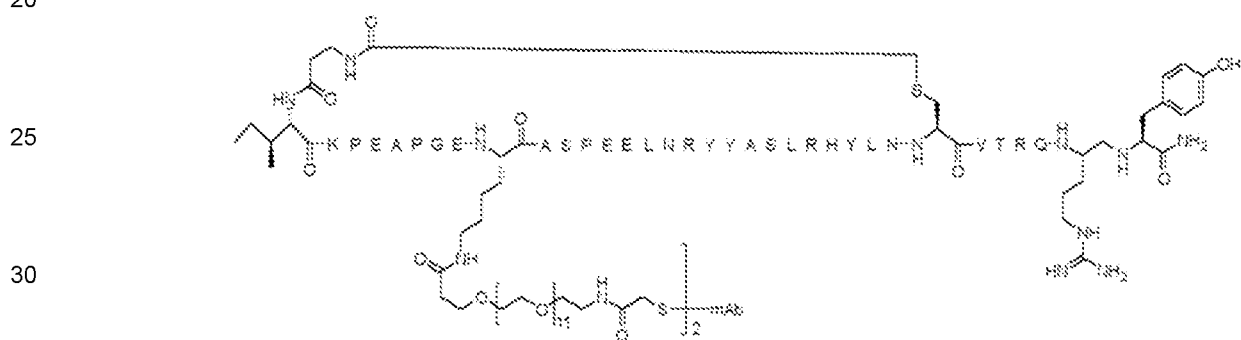
Estructura:



15 SEQ ID NO: 124

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(βA2COCH₂-C30), Conjugado homodímero de mAb K(PEG12)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 23)

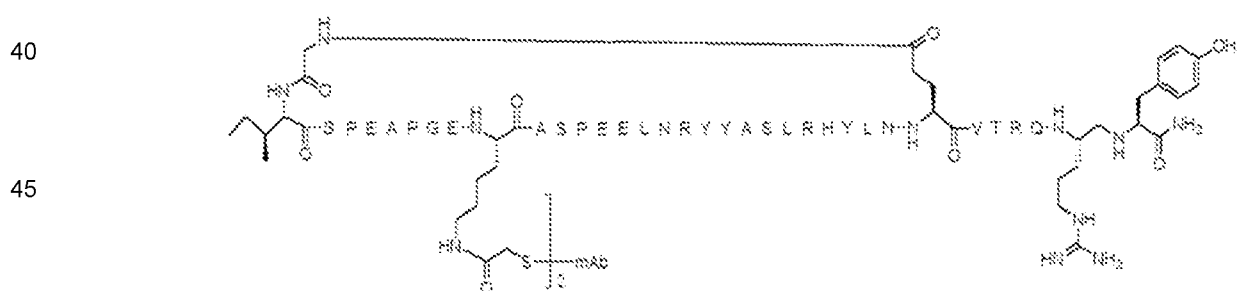
Estructura:



35 SEQ ID NO: 125

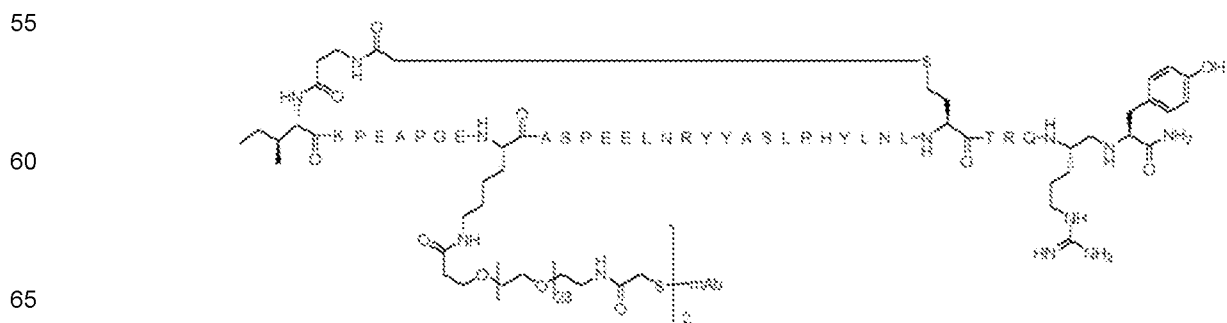
Nombre: Conjugado homodímero de [ciclo-(G2-E30), S4, K11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 24)

Estructura:



50 SEQ ID NO: 126

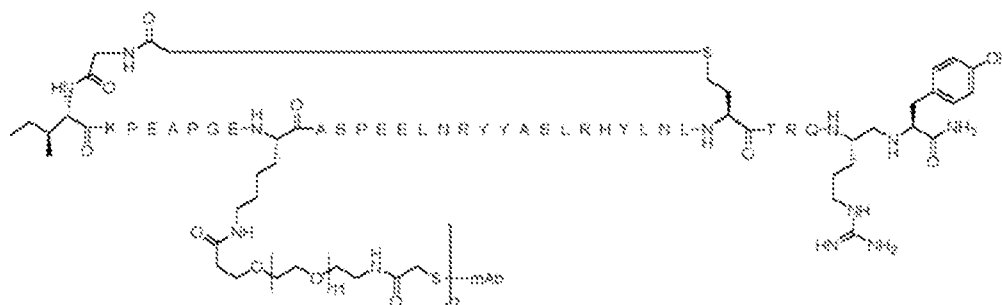
Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG24)11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36 (Compuesto 25)



SEQ ID NO: 127

Nombre: Conjugado homodímero de mAb [ciclo-(G2-Ac-hC31), K(PEG12)11, *psi*-(R35-Y36)]-PYY2-36 conjugado homodímero (Compuesto 26)

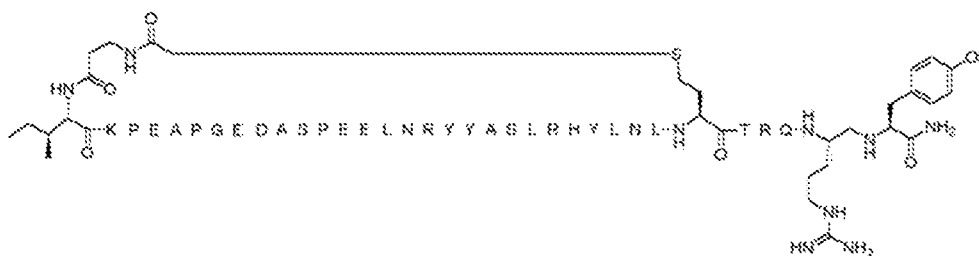
Estructura:



SEQ ID NO: 147

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

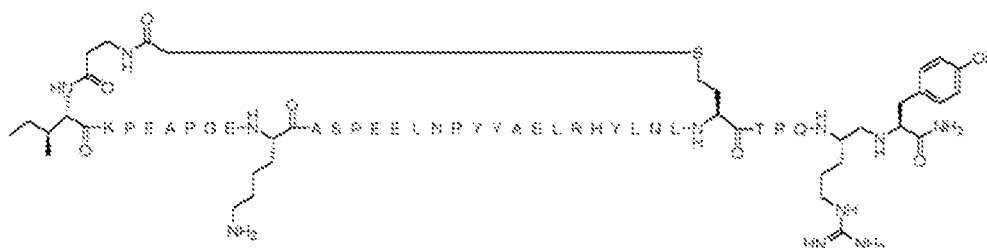
Estructura:



SEQ ID NO: 148

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-hC31), K11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

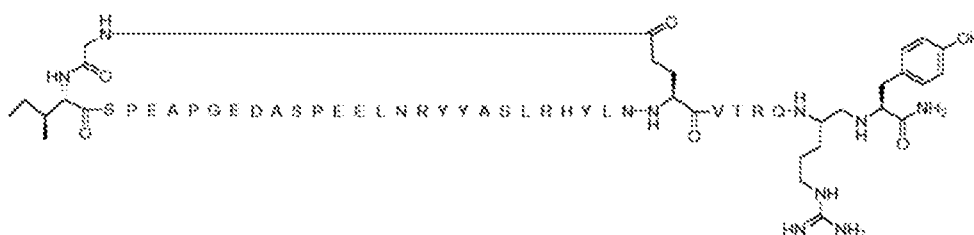
Estructura:



SEQ ID NO: 149

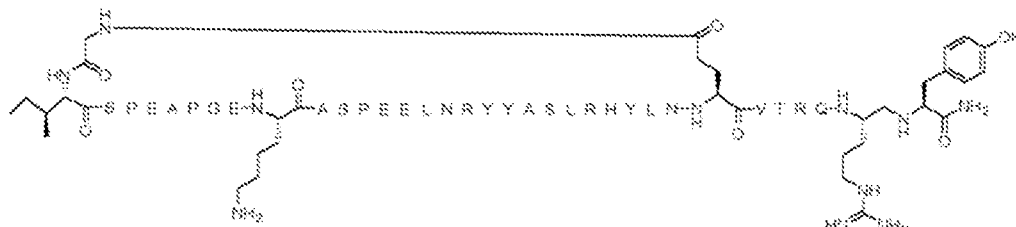
Nombre: [Ciclo-(G2-E30), S4, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36

Estructura:



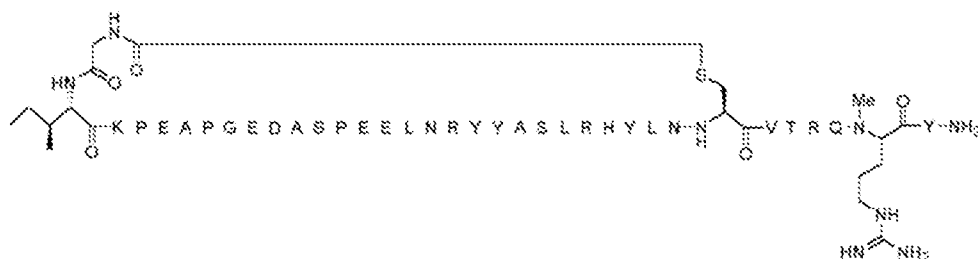
SEQ ID NO: 150

Nombre: [Ciclo-(G2-E30), S4,K11, *psi*-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



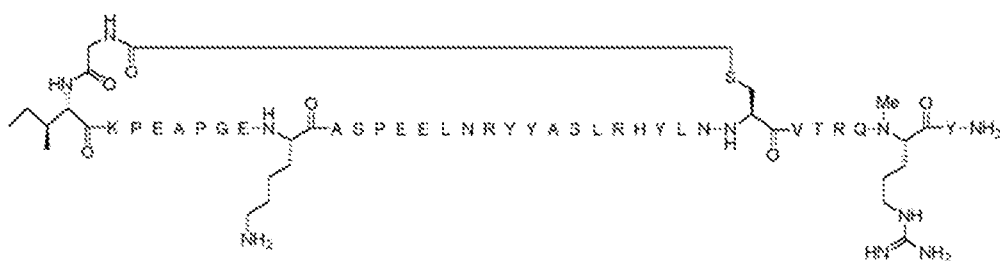
SEQ ID NO: 151

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



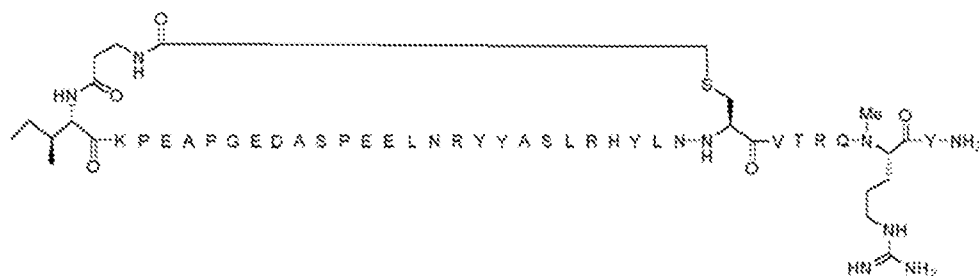
SEQ ID NO: 152

Nombre: [Ciclo-(G2-COCH₂-C30), K11, N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



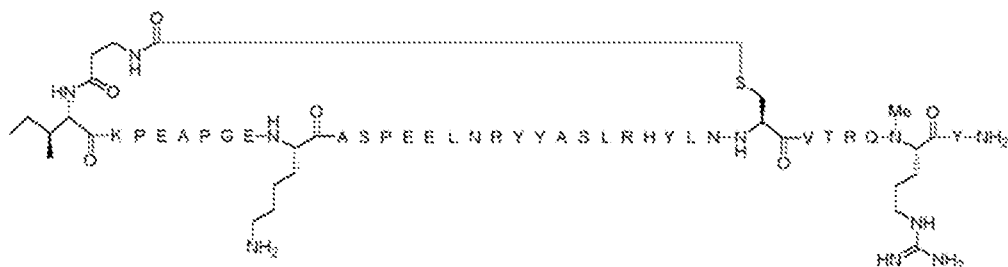
SEQ ID NO: 153

Nombre: [Ciclo-(βA2-COCH₂-C30), N-Me-R35]-PYY2-36
Estructura:



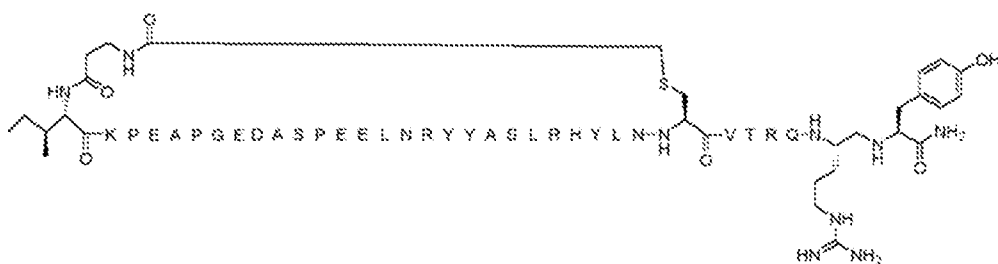
SEQ ID NO: 154

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-C30), K11, NMe-R35]-PYY2-36
Estructura:



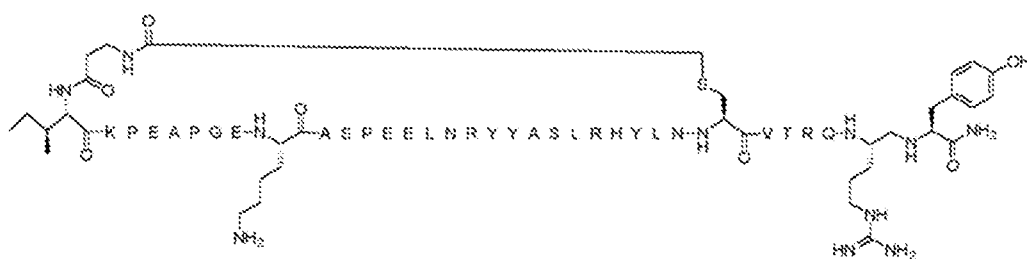
SEQ ID NO: 155

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-C30), psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:



SEQ ID NO: 156

Nombre: [Ciclo-(β A2-COCH₂-C30), K11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Estructura:

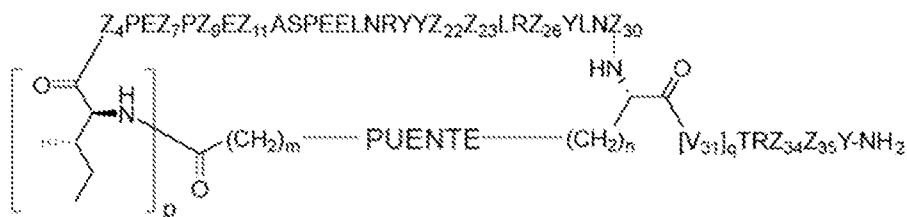


REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende:

(a) un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), un HCDR2, un HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), un LCDR2 y un LCDR3, que tienen las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 y 146, respectivamente; y

(b) al menos dos péptidos PYY cíclicos, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con los al menos dos péptidos PYY cíclicos, en donde los al menos dos péptidos PYY cíclicos están representados por la Fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma:



en donde

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

n es 1, 2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z₃₀ esté ausente;

PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S o R;

Z₇ es A o K;

Z₉ es G o K;

Z₁₁ es D o K;

Z₂₂ es A o K;

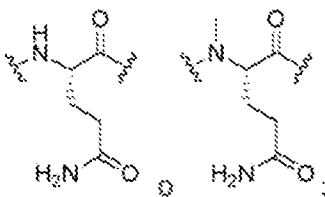
Z₂₃ es S o K;

Z₂₆ es A o H;

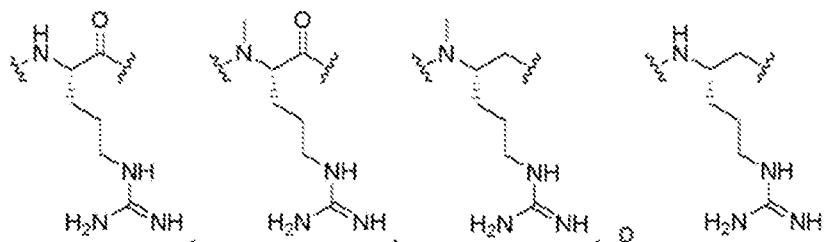
Z₃₀ es L, W, ausente o K;

siempre que Z₃₀ esté ausente solo cuando q sea 1;

Z₃₄ es



Z₃₅ es



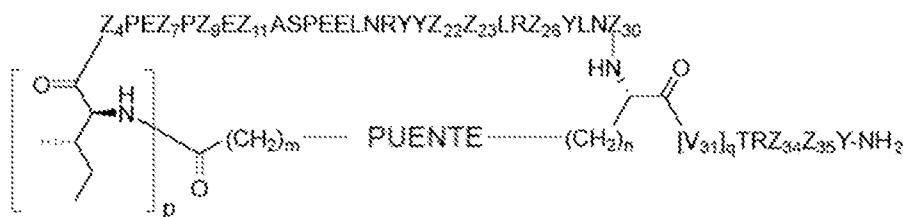
donde el derivado es el compuesto de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, glicosilación, carbamilación, sulfatación, fosforilación, ciclización, lipidación y pegilación.

2. Composición farmacéutica que comprende:

(a) un conjugado; y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable;

en donde el conjugado comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo acoplado a un péptido PYY cíclico, comprendiendo el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1), una HCDR2, una HCDR3, una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1), una LCDR2 y una LCDR3 que tienen las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 y 146, respectivamente; y en donde el péptido PYY cíclico está representado por Fórmula I o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Formula I

Donde

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

n es 1,

2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z30 esté ausente;

PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;

Z₄ es K, A, E, S o R;

Z₇ es A o K;

Z₉ es G o K;

Z₁₁ es D o K;

Z₂₂ es A o K;

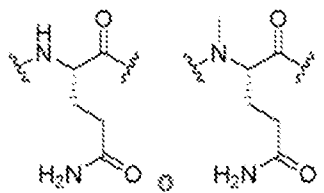
Z₂₃ es S o K;

Z₂₆ es A o H;

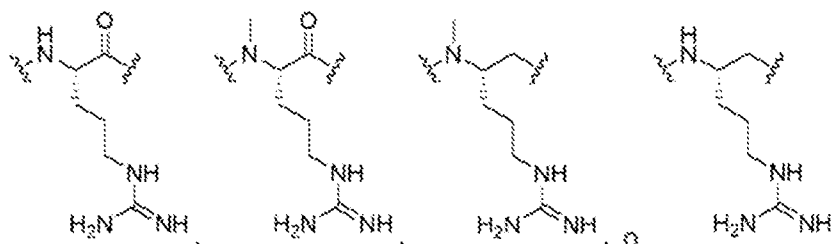
Z₃₀ es L, W, ausente o K;

siempre que Z₃₀ esté ausente solo cuando q sea 1;

Z₃₄ es



Z₃₅ es



en donde el derivado es el compuesto de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, glicosilación, carbamilación, sulfatación, fosforilación, ciclización, lipidación y pegilación, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesita, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en obesidad, diabetes tipo I o tipo II, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipoglucemia debido a hiperinsulinismo congénito (CHI), dislipidemia, aterosclerosis, nefropatía diabética, hipertensión, niveles de colesterol y/o lípidos no controlados, osteoporosis, inflamación, enfermedad del hígado graso no alcohólico 130 (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad renal y eczema, el método comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de la composición farmacéutica en combinación con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: un inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4); un agonista del receptor de GLP-1; un inhibidor del cotransportador sodio-glucosa-2 (SGLT-2); un secuestrador de ácidos biliares; un agonista del receptor dopaminérgico; una biguanida; insulina; oxintomodulina; una sulfonilurea; y una tiazolidinediona.

3. Conjugado según la reivindicación 1 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en el que cada péptido PYY cíclico es independientemente un compuesto de Fórmula I o un derivado del péptido PYY cíclico de Fórmula I que se modifica mediante uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en amidación, lipidación y pegilación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El conjugado de la reivindicación 1 o 3 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde cada péptido PYY cíclico está representado independientemente por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

p es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

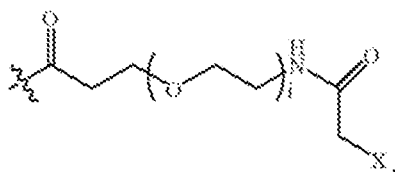
n es 1, 2, 3 o 4;

q es 0 o 1; siempre que q sea 1 solo cuando Z_{30} esté ausente;

PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;

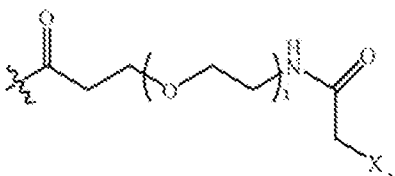
Z₄ es K, A, E, S o R;

Z₇ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



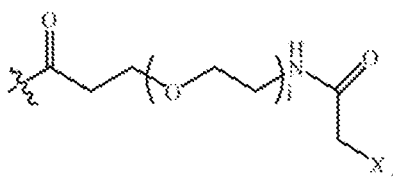
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl;

Z₉ es G o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



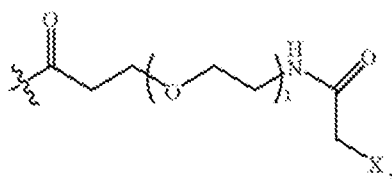
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl;

Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



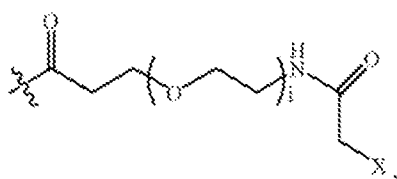
en donde i es un número entero de 0 a 24, y X = Br, I o Cl, -C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I, o -C(O)CH₂Cl;

Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con



5

10 en donde i es un número entero de 0 a 24, y $X = \text{Br}$, I o Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, o $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$; Z_{23} es S o K , en donde la cadena lateral amino de dicho K está opcionalmente sustituida con

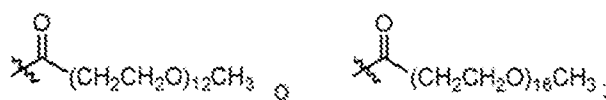


15

20

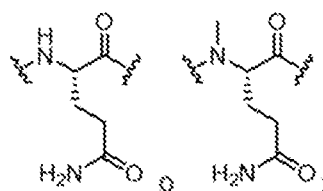
en donde i es un número entero de 0 a 24, y $X = \text{Br}$, I o Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$, o $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$; Z_{26} es A o H ; Z_{30} es L o K , en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con

25



30

Z_{34} es

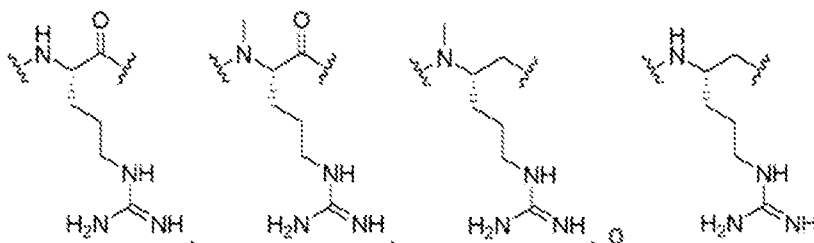


35

40

y Z_{35} es

45



50

55

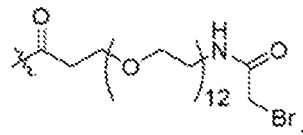
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde cada péptido PYY cíclico está representado independientemente por la Fórmula I o el derivado o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

60

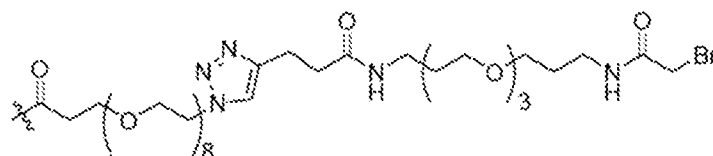
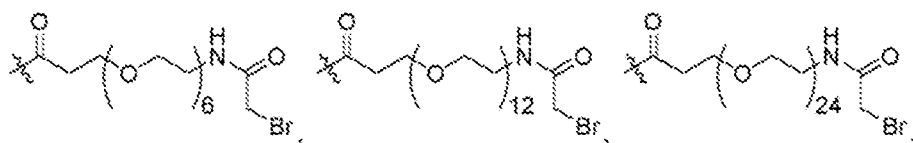
p es 0 o 1;
 m es 0, 1, 2, 3 o 5;
 n es 1, 2 o 4;
 q es 0 o 1; siempre que q pueda ser 1 solo cuando Z_{30} esté ausente;

65

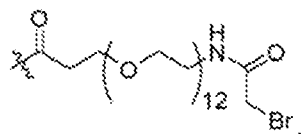
PUENTE es -Ph-CH₂-S-, -triazolil-, -NHC(O)CH₂S-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- o -CH₂S-;
 Z₄ es K, A, E, S o R;
 Z₇ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con



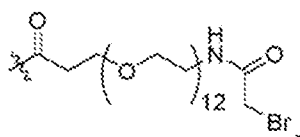
Z₉ es G o K,
 Z₁₁ es D o K, en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con



-C(O)CH₂Br,
 Z₂₂ es A o K, en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con



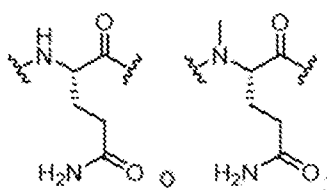
Z₂₃ es S o K, en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con



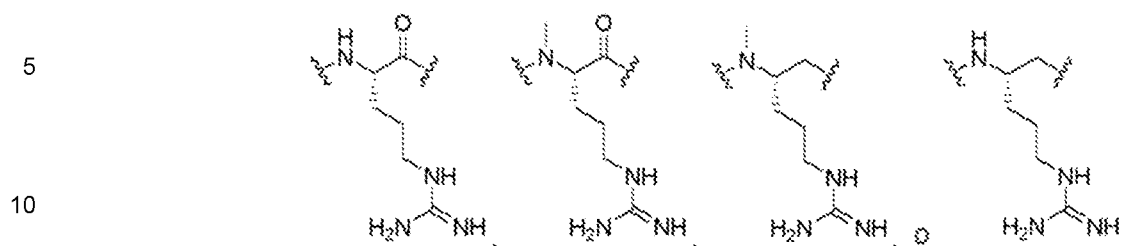
Z₂₆ es A o H, Z₃₀ es L o K, en donde la cadena lateral amino de dicha K está sustituida con



Z₃₄ es



Z₃₅ es



6. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde cada péptido PYY cíclico se selecciona independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 73-100 y 147-156, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, o composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno está unido covalentemente a cada péptido PYY cíclico en un residuo de lisina del péptido PYY cíclico a través de un enlazador.

8. Conjugado o composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en donde el enlazador comprende uno seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG)8-triazolil-CH₂CH₂CO-PEG4, una cadena de PEG de 2-24 unidades de PEG, una cadena de alquilo que contiene 2-10 átomos de carbono, (Gly₄Ser)_j donde j = 1-4, (AlaPro)_u donde u = 1-10, y un enlace.

9. El conjugado o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7 u 8, en donde solo uno de Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ y Z₂₃ en la Fórmula I es lisina, y la lisina está unida covalentemente a un residuo de cisteína diseñado del anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo a través del enlazador.

10. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9 o la composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 102-127 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

11. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-10 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 137, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 139.

12. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-11 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada (HC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 138 y una cadena ligera (LC) que tiene la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 140.

13. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en la que:

- (a) el inhibidor de DPP-4 se selecciona entre sitagliptina, saxagliptina, linagliptina y alogliptina; y/o
- (b) el agonista del receptor de GLP-1 se selecciona entre exenatida, lixisenatida, liraglutida, exenatida de liberación prolongada, albiglutida y dulaglutida; y/o
- (c) el inhibidor de SGLT-2 se selecciona entre canaglifozina, dapaglifozina y empaglifozina; y/o
- (d) el secuestrante de ácidos biliares es colesevelam; y/o
- (e) el agonista del receptor de dopamina es bromocriptina de liberación rápida; y/o
- (f) la biguanida es metformina; y/o
- (g) la sulfonilurea se selecciona entre clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, glibenclamida, glibornurida, glisoxepida, glicopiramida, tolazamida, tolbutamida, acetohexamida y carbutamida; y/o
- (h) la tiazolidinediona se selecciona entre pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona, ciglitazona, darglitazona, englitazona, netoglitazona, rivoglitazona y troglitazona.

14. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en la que el agente terapéutico es el agonista del receptor GLP-1 liraglutida.

15. Composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en la que la composición farmacéutica se administra antes, concomitantemente o posteriormente al agente terapéutico.

Fig. 1

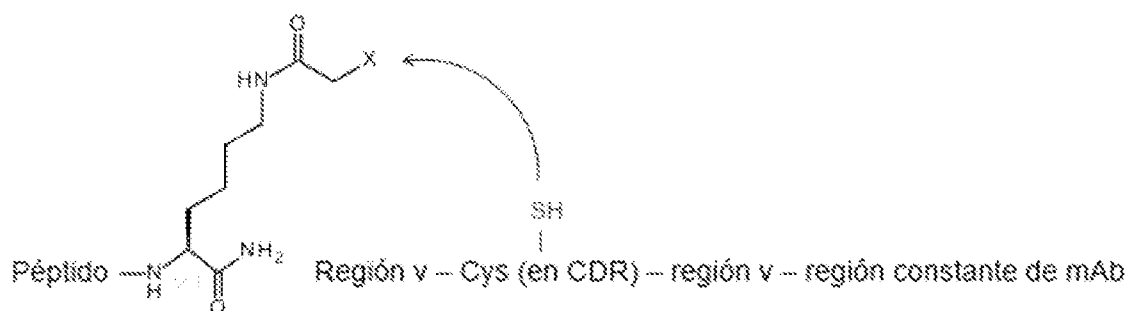


Fig. 2

PH9H5 VH (SEQ ID NO:129)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYDGIYGELDFWGQGTELVTVSS

PH9L3 VL (SEQ ID NO:128)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSG
SGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

Fig. 3

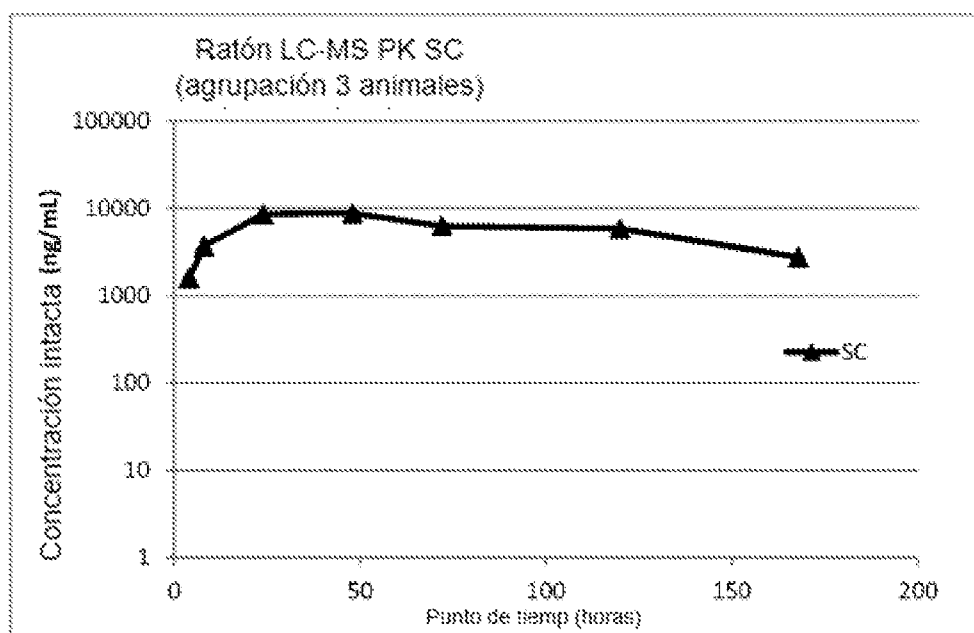


Fig. 4

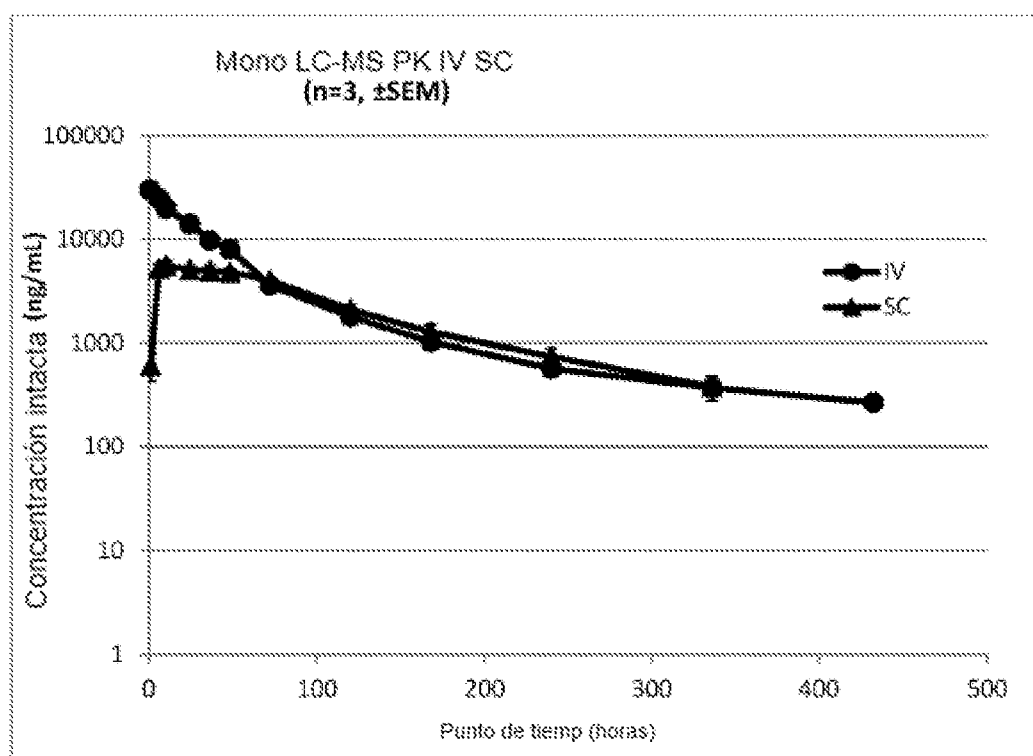


Fig. 5

Absorción de alimentos en ratones DIO post Compuesto 1

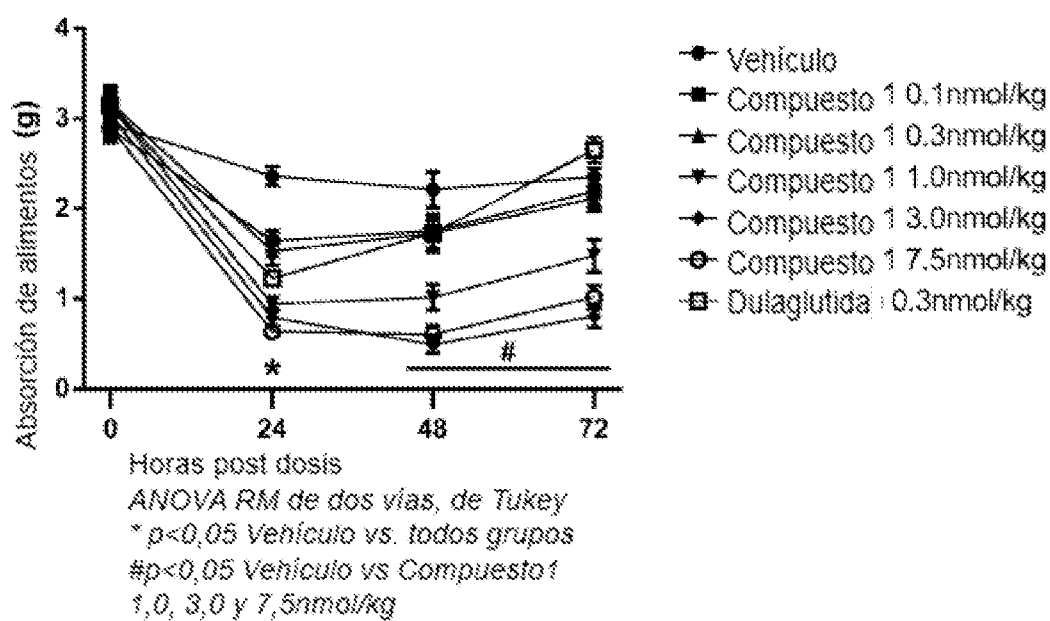


Fig. 6

Cambio peso corporal en ratones DIO post Compuesto 1

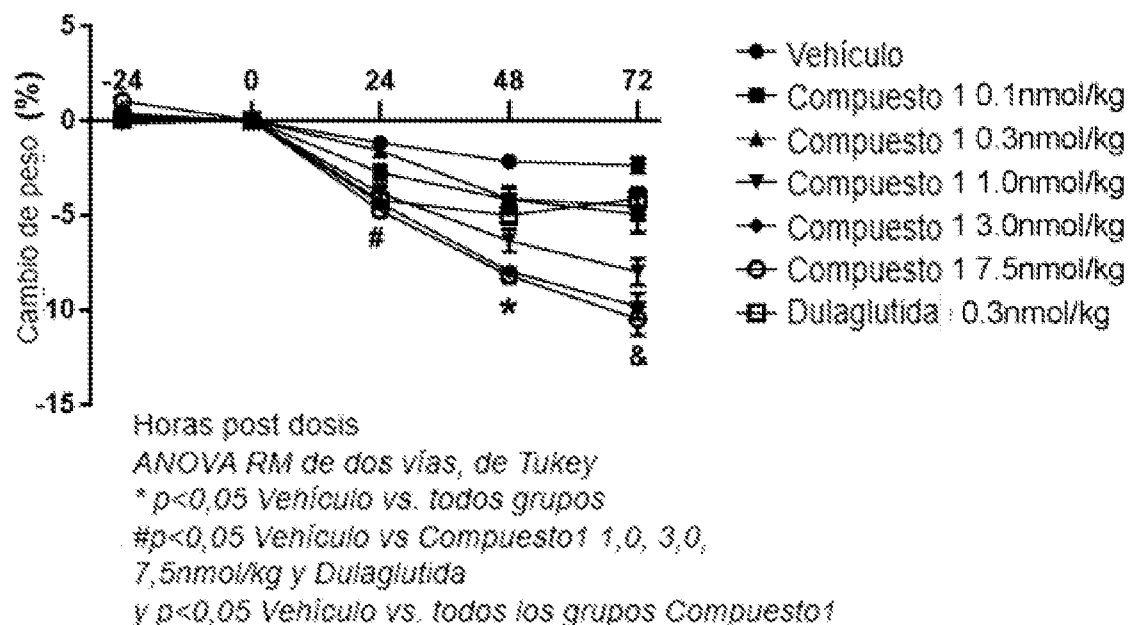


Fig. 7

Absorción de alimentos en ratones DIO post Compuesto 1

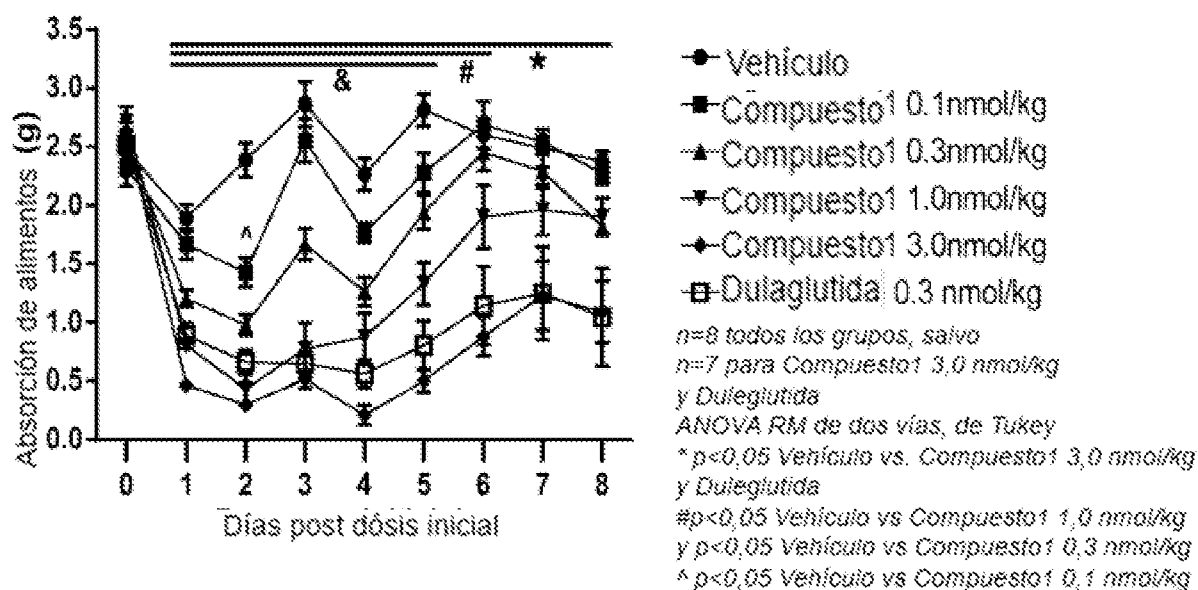


Fig. 8

Cambio peso corporal en ratones DIO post Compuesto 1

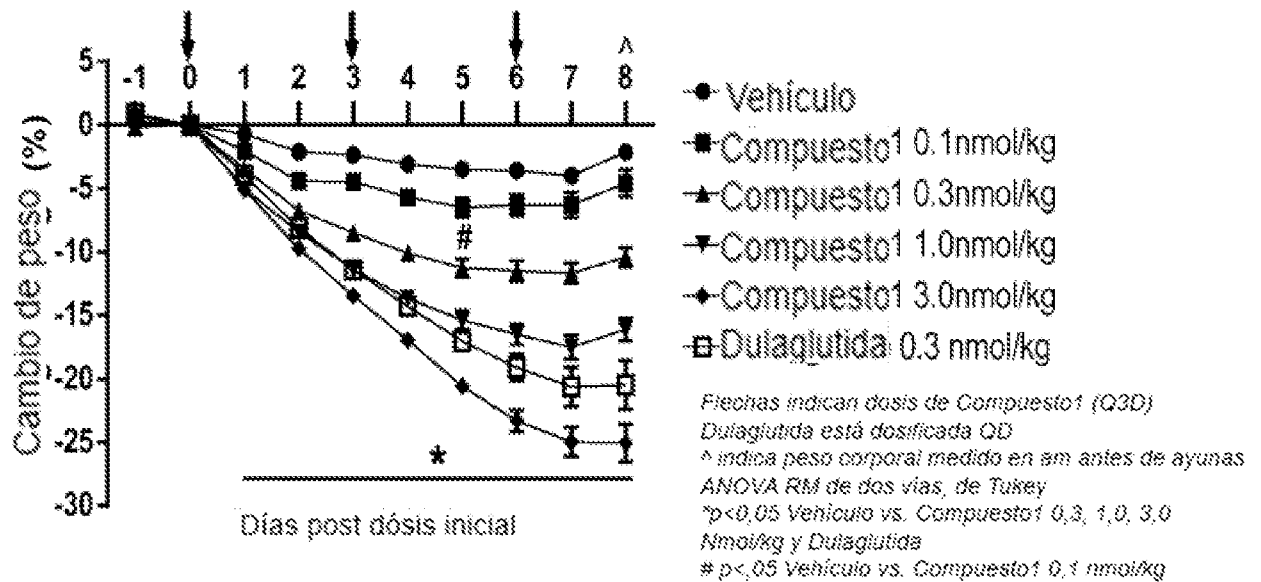


Fig. 9

Cambio peso corporal en ratones DIO

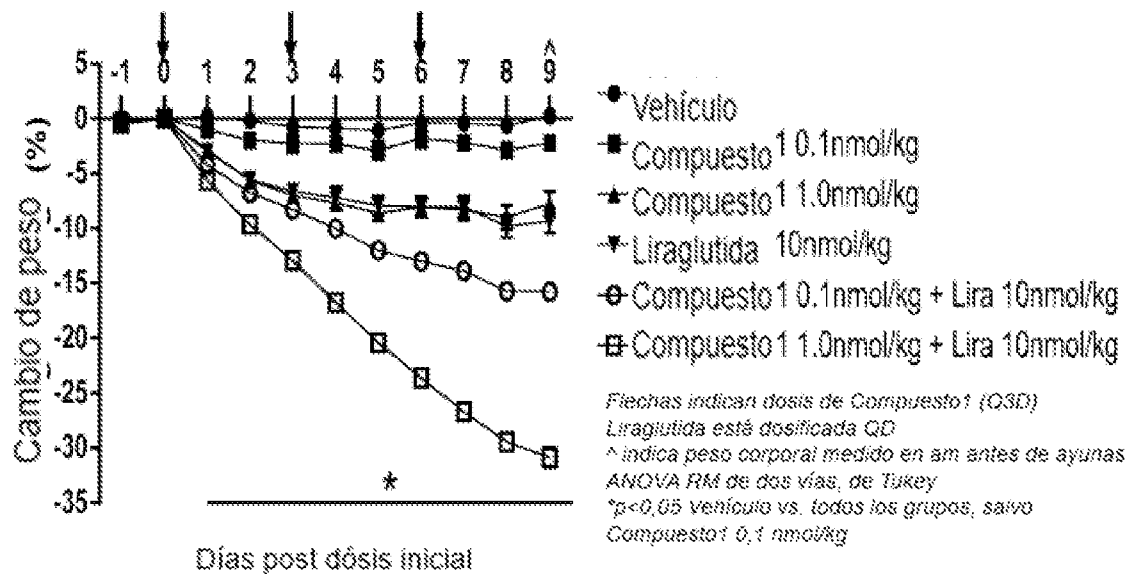


Fig. 10

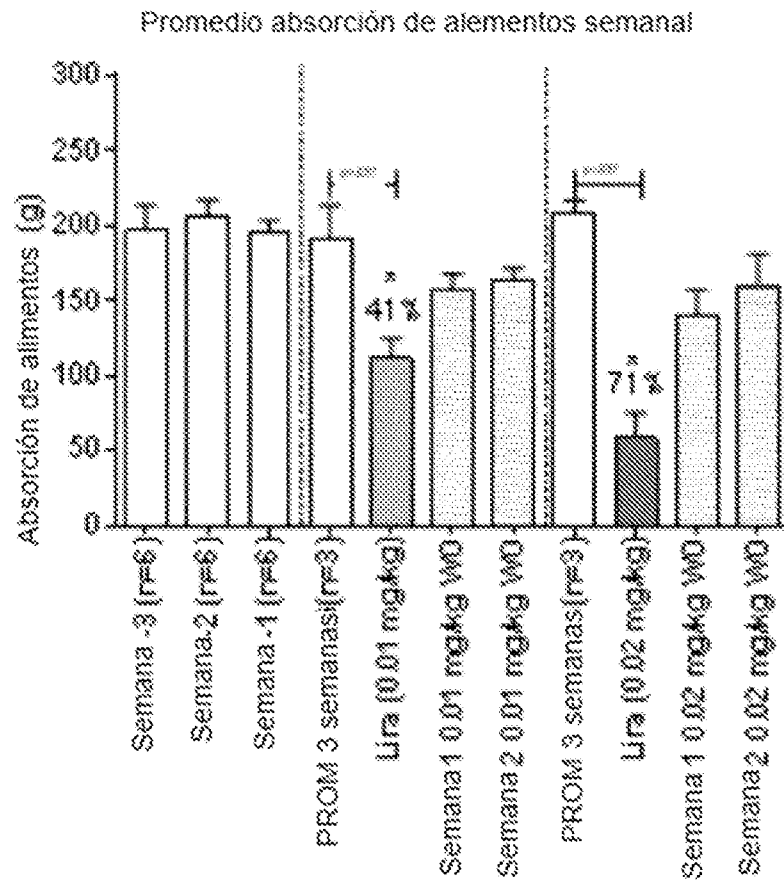


Fig. 11A

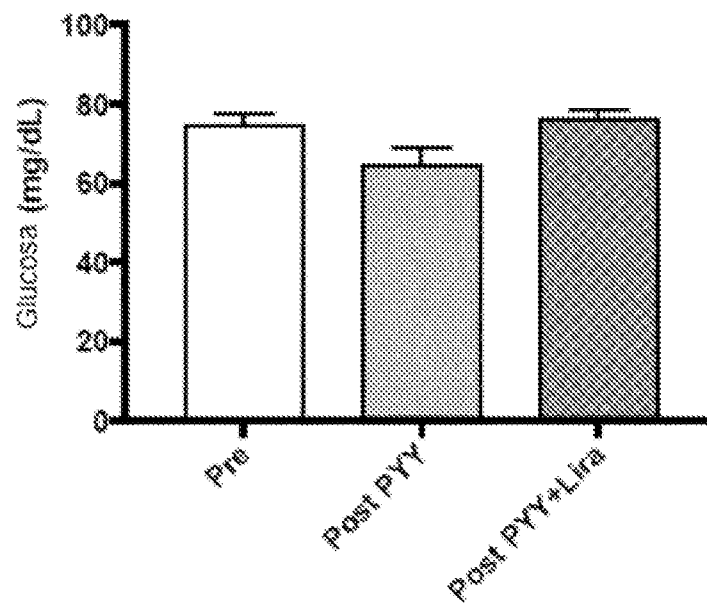


Fig. 11B

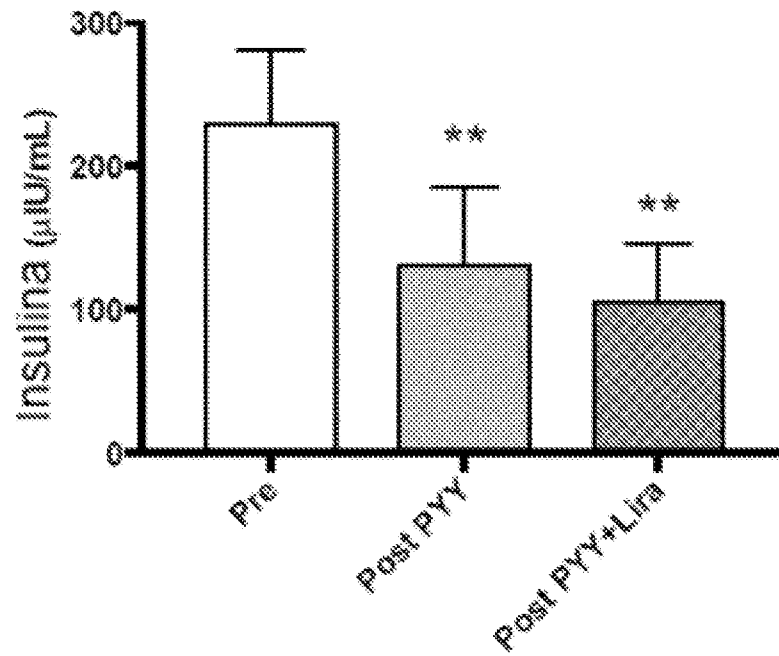


Fig. 11C

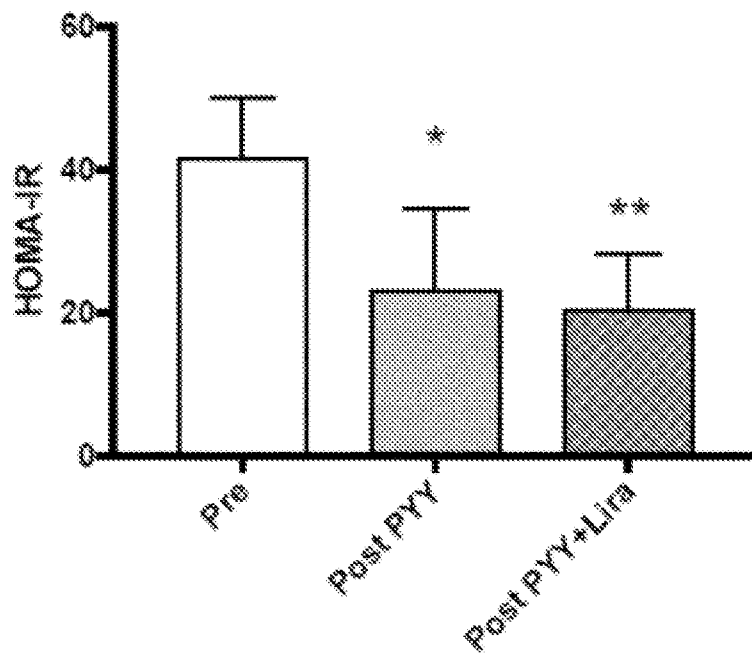


Fig. 11D

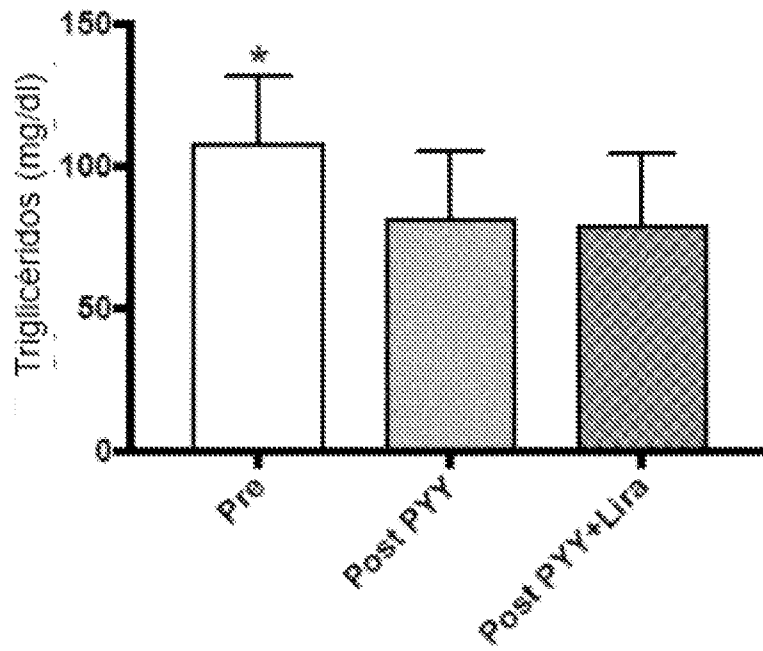


Fig. 12A

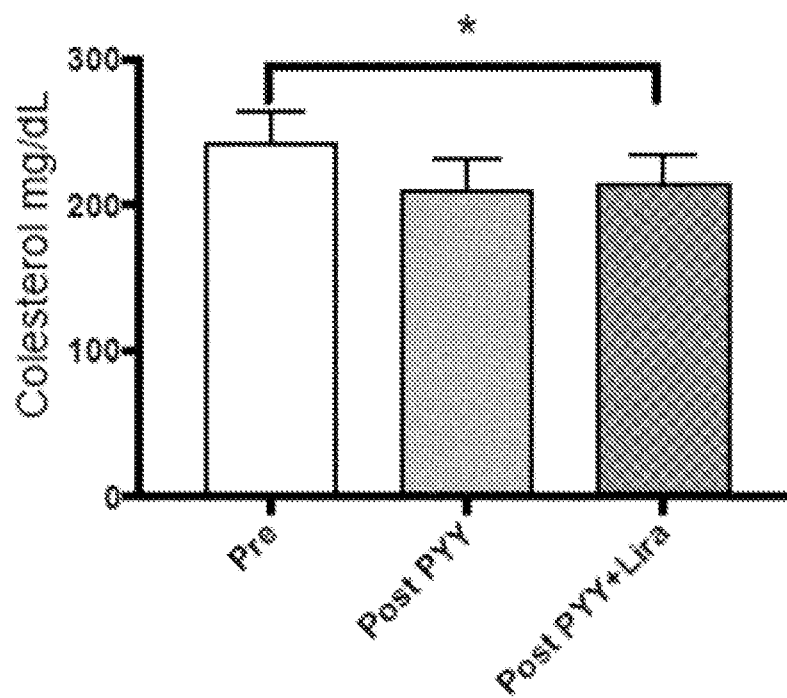


Fig. 12B

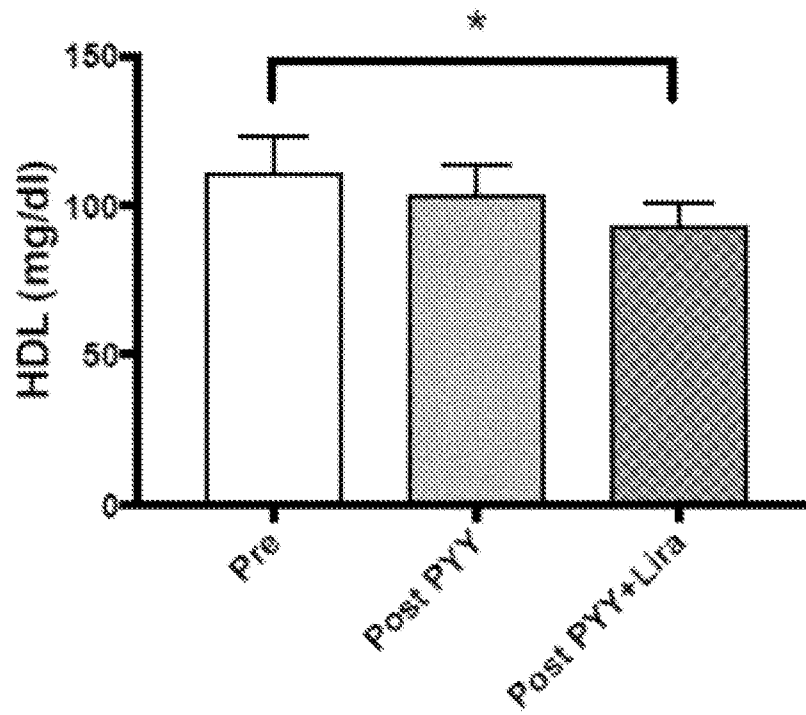


Fig. 12C

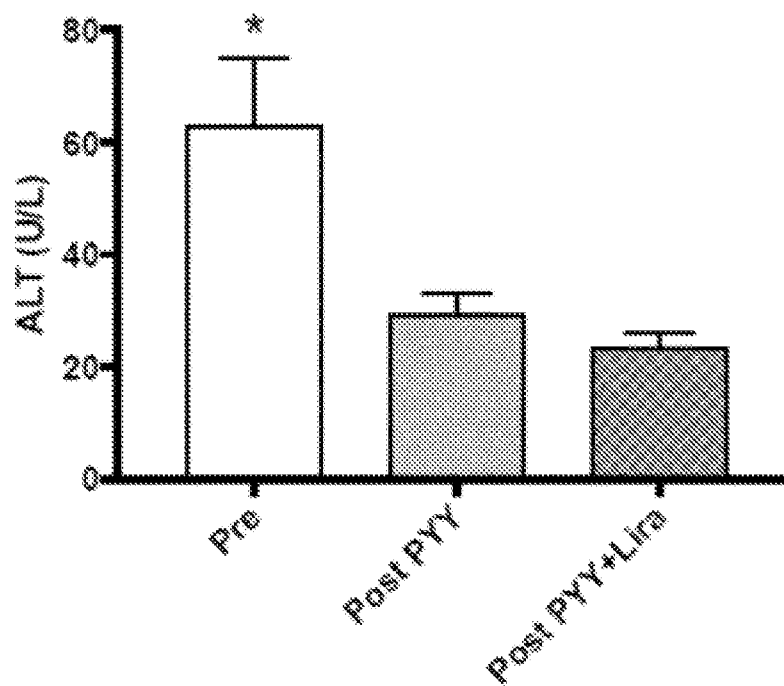


Fig. 12D

