



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 773**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05820773 .9**

96 Fecha de presentación : **01.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1814590**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados.**

30 Prioridad: **01.11.2004 US 624357 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2009**

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**9360 Towne Centre Drive**  
**San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es: **Roth, Jonathan;**  
**Anderson, Christen, M. y**  
**Baron, Alain**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 325 773 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

Tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico y en particular al campo de la salud, la dieta y la nutrición. La invención se refiere a la utilización de agentes antiobesidad.

10 **Antecedentes**

La obesidad y sus trastornos asociados son problemas comunes y muy graves de la salud pública en los Estados Unidos y en todo el mundo. La obesidad central es el factor de riesgo más potente conocido para la diabetes mellitus tipo 2 y es un potente factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular. La obesidad es un factor de riesgo reconocido para hipertensión, aterosclerosis, fallo cardíaco congestivo, apoplejía, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, apnea del sueño, trastornos reproductivos tales como el síndrome del ovario poliquístico, cánceres de mama, próstata, y colon, e incidencia aumentada de complicaciones de la anestesia general (véase, *por ejemplo*, Kopelman, Nature 404: 635-43 (2000)).

La obesidad reduce el tiempo de vida y acarrea un grave riesgo de las comorbilidades mencionadas anteriormente, así como trastornos tales como infecciones, venas varicosas, acantosis nigricans, eccema, intolerancia al ejercicio, resistencia a la insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, coledocistitis, lesión ortopédica, y enfermedad tromboembólica (Rissanen *et al.*, Br. Med. J. 301: 835-7 (1990)). La obesidad también es un factor de riesgo para el grupo de afecciones llamadas síndrome de resistencia a la insulina, o “síndrome X” y síndrome metabólico. El coste médico mundial de la obesidad y los trastornos asociados es enorme.

Se cree que la patogénesis de la obesidad es multifactorial. Un problema es que, en sujetos obesos, la disponibilidad de nutrientes y el gasto de energía no llegan al equilibrio hasta que se produce un exceso de tejido adiposo. El sistema nervioso central (SNC) controla el equilibrio de energía y coordina una diversidad de actividades del comportamiento, autónomas y endocrinas apropiadas para el estado metabólico del animal. Los mecanismos o sistemas que controlan estas actividades están ampliamente distribuidas a través del prosencéfalo (por ejemplo, hipotálamo), rombencéfalo (por ejemplo, tronco cerebral), y la médula espinal. Finalmente, la información metabólica (es decir, la disponibilidad de combustible) y cognitiva (es decir, las preferencias aprendidas) a partir de estos sistemas se integra y se activa (adquisición de comida e inicio) o inactiva (germinación de comida) la decisión para emprender los comportamientos del apetito (búsqueda de alimento) y de consumación (ingestión). Se cree que el hipotálamo es principalmente responsable de integrar estas señales y después emitir los comandos al tronco cerebral. Los núcleos del tronco cerebral que controlan los elementos del sistema de control motor de la consumación (por ejemplo, los músculos responsables de masticar y tragar). Por tanto, estos núcleos del SNC se han conocido literalmente como constituyentes de la “vía común final” para el comportamiento de ingestión.

Las evidencias neuroanatómicas y farmacológicas apoyan que las señales de la energía y la homeostasis nutricional se integran en los núcleos del prosencéfalo y que el sistema de control motor de la consumación reside en los núcleos del tronco cerebral, probablemente en regiones que rodean los núcleos motores trigeminales. Existe una conexión recíproca extensiva entre el hipotálamo y el tronco cerebral. Una diversidad de agentes terapéuticos antiobesidad dirigidos al SNC (por ejemplo, moléculas pequeñas y péptidos) se centran predominantemente en los sustratos del prosencéfalo que residen en el hipotálamo y/o en los sustratos del rombencéfalo que residen en el tronco cerebral.

La obesidad sigue siendo un trastorno metabólico poco tratable, crónico, esencialmente imposible de tratar. Por consiguiente, existe la necesidad de nuevas terapias útiles en la reducción del peso y/o el mantenimiento del peso en un sujeto. Dichas terapias conducirían a un profundo efecto beneficioso sobre la salud del sujeto.

**Sumario**

La presente invención proporciona usos y kits útiles en el control, el tratamiento y la prevención de la obesidad y las afecciones, trastornos y enfermedades relacionadas con la obesidad. La invención muestra la utilización de un primer agente antiobesidad seleccionado de entre amilina, un agonista de amilina o un análogo de amilina para la preparación de un medicamento para reducir el peso corporal en un sujeto humano, para tratar la obesidad o reducir la disponibilidad de nutrientes, en la que el medicamento tiene que administrarse en combinación con un segundo agente antiobesidad seleccionado de entre una leptina, un derivado de leptina o un agonista de leptina, en la que los agentes tienen que administrarse en cantidades eficaces para reducir el peso corporal del sujeto en por lo menos el 10%, y en la que la concentración sérica de leptina del sujeto es mayor de 10 ng/ml antes de la administración de los agentes antiobesidad.

La invención también proporciona un kit que comprende un primer agente antiobesidad seleccionado de entre amilina, un agonista de amilina o un análogo de amilina y un segundo agente antiobesidad seleccionado de entre una leptina, un derivado de leptina o un agonista de leptina para reducir el peso corporal en un sujeto humano, para tratar la obesidad o reducir la disponibilidad de nutrientes, donde los agentes tienen que administrarse en combinación, y donde los agentes tienen que administrarse en cantidades eficaces para reducir el peso corporal del sujeto en por lo

## ES 2 325 773 T3

menos el 10%, y donde la concentración sérica de leptina del sujeto es mayor de 10 ng/ml antes de la administración de los agentes antiobesidad.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona esta utilización y este kit para reducir la disponibilidad de nutrientes en un sujeto. En otro aspecto, la invención proporciona esta utilización y este kit para reducir el peso de un sujeto. En un aspecto, la presente invención proporciona un efecto antiobesidad sinérgico entre compuestos. En ciertas formas de realización, un agente antiobesidad administrado es la pramlintida.

10 En una forma de realización, la invención proporciona dicha utilización de un primer agente antiobesidad seleccionado de entre una amilina, un análogo de amilina o un agonista de amilina en combinación con un segundo agente antiobesidad seleccionado de entre una leptina, un derivado de leptina o un agonista de leptina, donde la administración de los agentes provoca un efecto sinérgico en comparación con la administración de cada agente solo.

15 A través de la utilización de la invención, el sujeto reduce su peso corporal en por lo menos el 10%, el sujeto reduce la masa grasa corporal, el sujeto pierde grasa ectópica, o cualquier combinación de los mismos.

20 En algunas formas de realización, el medicamento es para su uso por un sujeto humano que padece obesidad, un trastorno relacionado con la obesidad, una enfermedad relacionada con la obesidad, una afección relacionada con la obesidad, diabetes, síndrome de resistencia a insulina, lipodistrofia, esteatohepatitis no alcohólica, una enfermedad cardiovascular, síndrome del ovario poliquístico, síndrome metabólico o un deseo de perder peso corporal.

En un aspecto, la administración de los agentes antiobesidad en combinación puede ser administración simultánea, concurrente, o secuencial.

25 La presente invención también se refiere a la utilización de los agentes antiobesidad y composiciones de la presente invención para la preparación de un medicamento útil para tratar la obesidad.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es un gráfico que representa un efecto de la administración de leptina y amilina sobre la ingesta de alimentos.

La figura 2 es un gráfico que representa un efecto de la administración de leptina y amilina sobre el peso corporal.

35 La figura 3 es un gráfico que representa un efecto de la administración de leptina y amilina sobre la composición corporal.

40 La figura 4 es un gráfico que representa un efecto de la administración de leptina y amilina sobre la composición corporal.

La figura 5 es un gráfico que representa un efecto de la administración de leptina y amilina sobre el gasto de energía.

45 La figura 6A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 6B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación. La figura 6C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación.

50 La figura 7 es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de leptina sola (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), leptina sola en alimentación pareada (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), y leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) en combinación durante dos semanas.

55 La figura 8 muestra gráficos que representan las concentraciones séricas de leptina en animales normales HSD y propensos a DIO que recibieron vehículo, se alimentaron de forma pareada al grupo tratado con amilina, o recibieron amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante dos semanas.

60 La Figura 9A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de vehículo o leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) en animales normales. La figura 9B es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de vehículo o leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) en animales propensos a DIO.

65 La figura 10A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de sibutramina (3 mg/kg/día) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 10B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de sibutramina (3 mg/kg/día) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación. La figura 10C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de sibutramina (3 mg/kg/día) y amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), solos o en combinación.

## ES 2 325 773 T3

La figura 11A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de fentermina (10 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 11B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de fentermina (10 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación. La figura 11C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de fentermina (10 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación.

La figura 12A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de rimonabant (3 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 12B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de rimonabant (3 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación. La figura 12C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de rimonabant (3 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación.

La figura 13 es un gráfico que representa el efecto de la administración de un intervalo de dosis de un antagonista de CB-1, solo o en combinación con amilina (100 µg/kg/día), sobre el peso corporal. El transcurso del tiempo de las combinaciones en el área rodeada por un círculo se representa en las Fig. 14A y B.

La figura 14A es un gráfico que representa el efecto de la administración de un antagonista de CB-1 (11 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación, sobre el peso corporal. La figura 14B es un gráfico que representa el efecto de la administración de un antagonista de CB-1 (3 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación, sobre el peso corporal.

La figura 15A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de un análogo de exendina-4 (10 µg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 15B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de un análogo de exendina-4 (10 µg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación. La figura 15C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de exendina-4 (10 µg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación.

La figura 16A es un gráfico que representa un efecto sobre el peso corporal de la administración de PYY(3-36) (1 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación durante dos semanas. La figura 16B es un gráfico que representa un efecto sobre la grasa corporal de una administración de dos semanas de PYY(3-36) (1 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación. La figura 16C es un gráfico que representa un efecto sobre las proteínas corporales de una administración de dos semanas de PYY(3-36) (1 mg/kg/día) y amilina (100 µg/kg/día), solos o en combinación.

### Descripción detallada

Se ha descubierto que la administración de un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal en combinación con un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal es sorprendentemente eficaz para reducir la disponibilidad de nutrientes y para tratar la obesidad y afecciones, trastornos y enfermedades relacionadas con la obesidad. Se ha descubierto que cuando la administración de dichos agentes antiobesidad se combina de este modo, los agentes antiobesidad son más eficaces para reducir la disponibilidad de nutrientes en el destinatario que la utilización de uno de los agentes solo. Como se muestra en la presente memoria, por ejemplo, una combinación de agentes antiobesidad puede actuar de forma sinérgica para reducir la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, para reducir el peso, reducir la grasa, reducir la ingesta de alimentos, o cualquier combinación de estos tres.

Se han identificado las áreas particulares del prosencéfalo (constituyentes derivados del telencéfalo y diencefalo del cerebro) y el rombencéfalo o el tronco cerebral (incluyendo el mesencéfalo, puente de Varolio y la médula) que están implicadas en el control del equilibrio de energía. Las estructuras del prosencéfalo o los núcleos que residen en el hipotálamo implicados en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal incluyen, por ejemplo, el núcleo arqueado (NA), el núcleo paraventricular (NPV), el hipotálamo dorsomedial (HDM), el núcleo ventromedial (HVM), y el núcleo lateral del hipotálamo (HL). Las estructuras del rombencéfalo o los núcleos que residen en el tronco cerebral implicados en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal incluyen, por ejemplo, el núcleo del tracto solitario (NTS), el área postrema (AP), y el núcleo parabraquial lateral (NPBl). Los núcleos del tronco cerebral que controlan los elementos del sistema de control motor de la consumación probablemente están controlados por proyecciones de orden primario o secundario desde regiones del tronco cerebral como el NTS, AP, y PBl. Es notable que el AP, NTS y PBl han demostrado en su totalidad presentar (colectiva e independientemente) su propia capacidad de integración.

Una diversidad de agentes antiobesidad dirigidos al SNC actúan sobre estas estructuras del prosencéfalo que residen en el hipotálamo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal. Además, los agentes antiobesidad dirigidos al SNC actúan sobre las estructuras del rombencéfalo que residen en el tronco cerebral implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal. Se describen ejemplos de dichos agentes antiobesidad en la presente memoria. Véase la Tabla 1, para los ejemplos. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, anta-

gonistas del receptor del neuropéptido Y1 (NPY1), antagonistas del receptor de NPY5, leptina y agonistas de leptina, el factor neurotrófico ciliar (FNTC) y agonistas del FNTC, la hormona de concentración de melanina (HCM) y antagonistas de HCM, melanocortinas (MC) y agonistas de MC, antagonistas del receptor cannabinoide (CB-1), serotonina (5-HT) y agonistas de 5-HT, el péptido YY (PYY) y agonistas de PYY, exendina y agonistas de exendina, GLP-1 y agonistas de GLP-1, inhibidores de DPP-IV, grelina y antagonistas de grelina, colecistoquinina (CCK) y agonistas de CCK, y amilina y agonistas de amilina.

Se ha informado de los efectos del agente dirigido al prosencéfalo en combinación con un agente dirigido al rombencéfalo para una diversidad de indicaciones. Por ejemplo, el efecto de un antagonista de HCM no peptídico (dirigido al prosencéfalo) en combinación con un agonista de CCK (dirigido al metencéfalo) según se informa se ha estudiado con respecto al tratamiento de la obesidad y/o la anorexia (publicación PCT N° WO 03/047568). Otros ejemplos adicionales de combinaciones de agentes dirigidos al prosencéfalo y al rombencéfalo incluyen los siguientes: un antagonista del HCM-1R en combinación con un agonista CCK para su utilización en el tratamiento o prevención de la obesidad (publicación PCT N° WO 03/045920); un antagonista de HCM en combinación con un agonista de CCK para el tratamiento de la obesidad y la regulación del apetito (publicación de solicitud US n° 2004/0132752); exendina o un agonista de exendina en combinación con CCK o un agonista de amilina para el tratamiento de la obesidad y la reducción del apetito (publicación PCT N° 00/66629); exendina o un agonista de exendina en combinación con CCK, amilina o un agonista de amilina para tratar afecciones o trastornos que pueden aliviarse reduciendo la ingesta de alimentos (publicación PCT N° 98/30231); GLP-1 en combinación con CCK-33 para la reducción de la ingesta de alimentos (Gutzwiller *et al.*, 2004, Amer. J. Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 287:R562-R567); un agonista de GLP-1 en combinación con un agonista de CCK para el tratamiento de la obesidad (publicación de solicitud US n° 2003/0220255); un derivado de GLP-1 en combinación con un agonista de CCK para el tratamiento de la obesidad (patente US 6.458.924); PYY o un agonista del mismo en combinación con amilina y un agonista de amilina para la reducción de la ingesta de alimentos o la reducción del apetito (publicación PCT N° WO 03/057235); un antagonista del receptor de NPY5 en combinación con un agonista de CCK para el tratamiento de la obesidad (patente US 6.313.298; publicación PCT N° WO 2004/009015); leptina en combinación con CCK para el tratamiento de la obesidad (Matson *et al.*, 1997, Peptides 18:1275-1278; Matson *et al.*, 2000, Amer. J. Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 278:R882-R890); leptina o exendina(1-39) en combinación con CCK-8 para la inhibición de la ingesta de alimentos (Publicación de solicitud US n° 2004/0116657); un ligando, un agonista o antagonista del receptor de 5-HT2c en combinación con un agonista de CCK para el tratamiento de la obesidad (publicación PCT N° WO 03/000663; publicación PCT N° WO 2004/056324).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

*Dianas antiobesidad individuales y localización*

Sistema de Señalización	Región del SNC	Papel en la Ingesta de Alimentos	Agentes antiobesidad
Neuropéptido Y (NPY)	Prosencéfalo (NA/NPV)	Aumenta la ingesta	Antagonistas del receptor de NPY1 y NPY5
Leptina	Prosencéfalo (NA)	Disminuye la ingesta	Leptina, o agonistas
Factor neurotrófico ciliar (FNTC)	Prosencéfalo (NA)	Disminuye la ingesta	FNTC (Axokine®)
Hormona de concentración de melanina (HCM)	Prosencéfalo (NA/NPV)	Aumenta la ingesta	Antagonistas de HCM
Melanocortinas (MC)	Prosencéfalo (NPV/NA)	Agonistas disminuyen la ingesta	Agonistas de MC4
Cannabinoides (CB)	Prosencéfalo (extendido)	Aumentan la ingesta	Antagonistas del receptor cannabinoide
Serotonina (5-HT)	Prosencéfalo (HVM)	Disminuyen la ingesta	Agonistas de 5-HT2C
Péptido YY (PYY)	Prosencéfalo (NA)	Disminuyen la ingesta	Agonistas de PYY(3-36)
Péptido tipo glucagón-1 (GLP-1)	Prosencéfalo (NPV)	Disminuyen la ingesta	Exenatida y otros ligandos de GLP-1, inhibidores de DPP-IV
Grelina	Prosencéfalo (NA)	Aumentan la ingesta	Antagonistas de grelina
Colecistoquinina (CCK)	Rombencéfalo (AP)	Disminuyen la ingesta	Agonistas de CCK
Amilina	Rombencéfalo (AP)	Disminuyen la ingesta	Agonistas de amilina, Pramlintida, análogos de amilina

El primer compuesto está dirigido predominantemente a los centros de equilibrio de la energía del hipotálamo, tales como el NA, NPV, VM, y HL. El segundo compuesto está dirigido predominantemente a los centros de equilibrio de la energía del rombencéfalo tales como el AP y el PBNI.

Estos compuestos son agentes antiobesidad. La invención incluye la utilización de uno o más agentes antiobesidad que actúan predominantemente en el prosencéfalo. La invención también incluye la utilización de uno o más agentes antiobesidad que actúan predominantemente en el metencéfalo. Los agentes antiobesidad adicionales incluyen una leptina o un agonista de leptina o derivado, y una amilina o un agonista o análogo de amilina.

Como se ejemplifica en la presente memoria, los agonistas y antagonistas que son agentes antiobesidad en la invención incluyen, por ejemplo, moléculas tales como péptidos, polipéptidos y agentes de molécula pequeña.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

#### Definiciones

Un "agente antiobesidad" es un compuesto que es capaz de reducir la disponibilidad de nutrientes en el cuerpo después de su administración. Un "agente inductor del peso" es un compuesto que aumentaría la disponibilidad de nutrientes en el cuerpo. En un aspecto, un agente inductor del peso es un antagonista de un agente antiobesidad.

## ES 2 325 773 T3

Como se utiliza en la presente memoria, un agente antiobesidad que “actúa sobre una estructura del prosencéfalo implicada en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal” estimula o suprime la actividad de una región particular, por ejemplo, núcleos y/o circuitos neuronales particulares, en el prosencéfalo. Esta estimulación o supresión del prosencéfalo conduce a una reducción en la disponibilidad de nutrientes en el cuerpo. Un agente antiobesidad que  
5 “actúa sobre una estructura del rombencéfalo implicada en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal” estimula o suprime la actividad de una región particular, por ejemplo, núcleos y/o circuitos neuronales particulares, en el metencéfalo. Esta estimulación o supresión del rombencéfalo provoca una reducción en la disponibilidad de nutrientes en el cuerpo.

Se entiende que la “disponibilidad reducida de nutrientes” incluye todos los medios por los que el cuerpo reduce los nutrientes disponibles en el cuerpo para almacenarlos como grasa. En otras palabras, la reducción de la disponibilidad de nutrientes puede ser por medios que incluyen, de manera no limitativa, reducir el apetito, aumentar la saciedad, afectar a la preferencia de alimentos/aversión a sabores, aumentar el metabolismo, y/o disminuir o inhibir la absorción de alimentos. Los mecanismos ejemplificados que pueden estar afectados incluyen el vaciado gástrico retardado o  
15 absorción disminuida de los alimentos en los intestinos.

Se entiende que la “disponibilidad aumentada de nutrientes” incluye todos los medios por los que el cuerpo aumenta los nutrientes disponibles en el cuerpo para almacenarlos como grasa. En otras palabras, el aumento de la disponibilidad de nutrientes puede ser por cualesquiera medios que incluyen, de manera no limitativa, aumentar el apetito,  
20 disminuir la saciedad, afectar a la preferencia de alimentos, disminuir la aversión a los sabores, disminuir el metabolismo, y/o aumentar la absorción de alimentos. Los mecanismos ejemplificados que pueden estar afectados incluyen la disminución de la hipomotilidad gástrica o el aumento de la absorción de alimentos en los intestinos.

Aunque la “obesidad” se define generalmente como un índice de masa corporal (IMC) por encima de 30, en el contexto de la presente exposición, cualquier sujeto, incluyendo los que presentan un índice de masa corporal de menos de 30, que necesite o desee reducir su peso corporal o prevenir la ganancia de peso corporal se incluye en el marco de “obeso”. Por tanto, los sujetos con un IMC de menos de 30 y 25 y por encima (considerado sobrepeso) o por debajo de 25 también se incluyen en los sujetos de la invención. La obesidad mórbida se refiere a un IMC de 40 o mayor.  
30

Con respecto a la reducción de la disponibilidad de nutrientes, como se utiliza en la presente memoria, un “sujeto que lo necesite” incluye sujetos que tienen sobrepeso u obesidad u obesidad mórbida, o deseos de perder peso. Además, los sujetos que son resistentes a la insulina, intolerantes a la glucosa, o que tienen cualquier forma de diabetes mellitus (por ejemplo, tipo 1, 2 o diabetes gestacional) pueden beneficiarse de reducir la disponibilidad de nutrientes.  
35

Con respecto a aumentar la disponibilidad de nutrientes, como se utiliza en la presente memoria, un “sujeto que lo necesite” incluye los sujetos que tienen bajo peso o deseos de ganar peso.

Se entiende que un “sujeto” es un ser humano.  
40

Por “índice metabólico” se hace referencia a la cantidad de energía liberada/gastada por unidad de tiempo. El metabolismo por unidad de tiempo puede estimarse por el consumo de alimentos, la energía liberada como calor, o el oxígeno usado en procesos metabólicos. Generalmente es deseable tener un mayor índice metabólico cuando se desea perder peso. Por ejemplo, una persona con un elevado índice metabólico puede ser capaz de gastar más energía (por ejemplo, el cuerpo quema más calorías) para realizar una actividad que una persona con un bajo índice metabólico para esa actividad.  
45

Como se utiliza en la presente memoria, “masa magra” o “masa corporal magra” se refiere a los músculos y huesos. La masa corporal magra no indica necesariamente la masa sin grasa. La masa corporal magra contiene un pequeño porcentaje de grasa (casi el 3%) dentro del sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), la médula de los huesos, y los órganos internos. La masa corporal magra se mide en términos de densidad. Los métodos para medir la masa grasa y la masa magra incluyen, de manera no limitativa, pesado bajo el agua, pletismografía por desplazamiento de aire, rayos x, exploraciones DEXA, MRI y exploraciones CT. En una forma de realización, la masa grasa y la masa magra se miden usando pesado bajo el agua.  
55

Por “distribución de grasa” se hace referencia a la localización de los depósitos de grasa en el cuerpo. Dichas localizaciones de deposición de grasa incluyen, por ejemplo, depósitos de grasa subcutáneos, viscerales y ectópicos.

Por “grasa subcutánea” se hace referencia al depósito de lípidos justo por debajo de la superficie cutánea. La cantidad de grasa subcutánea en un sujeto puede medirse usando cualquier método disponible para la medición de la grasa subcutánea. Los métodos para medir la grasa subcutánea son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la patente US nº 6.530.886, cuya totalidad se incorpora a la presente memoria como referencia.  
60

Por “grasa visceral” se hace referencia al depósito de grasa en forma de tejido adiposo intraabdominal. La grasa visceral rodea los órganos vitales y puede metabolizarse por el hígado para producir colesterol sanguíneo. La grasa visceral se ha asociado con riesgos aumentados de afecciones tales como el síndrome del ovario poliquístico, el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares.  
65

Por “almacenamiento de grasa ectópica” se hace referencia a los depósitos lipídicos dentro y alrededor de los tejidos y órganos que constituyen la masa corporal magra (por ejemplo, músculo esquelético, corazón, hígado, páncreas, riñones, vasos sanguíneos). Generalmente, el almacenamiento de grasa ectópica es una acumulación de lípidos fuera de los depósitos de tejido adiposo clásico en el cuerpo.

Como se utiliza en la presente memoria, y es bien conocido en la técnica, el “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. “Tratar” o “paliar” una enfermedad, trastorno, o afección significa que se reduce el grado y/o las manifestaciones clínicas indeseables de una afección, trastorno, o patología y/o se ralentiza o prolonga el transcurso del tiempo del progreso, en comparación con no tratar el trastorno. Por ejemplo, al tratar la obesidad, una disminución en el peso corporal, por ejemplo, una disminución de por lo menos el 5% en el peso corporal, es un ejemplo de un resultado de tratamiento deseable. En el contexto de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, de manera no limitativa, el alivio o mejora de uno o más síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retardo o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento. Además, el tratamiento no sucede necesariamente por administración de una dosis, sino que a menudo sucede después de la administración de una serie de dosis. Por tanto, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz, una cantidad suficiente para paliar, o una cantidad suficiente para tratar una enfermedad, trastorno, o afección en una o más administraciones.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de los compuestos activos en la composición que provocará la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujeto, o ser humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas del trastorno que se está tratando. Los nuevos usos y kits de esta invención son para trastornos conocidos para los expertos en la materia.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” hace referencia a la cantidad de los compuestos activos en la composición que provocará la respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, sujetos, o ser humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro clínico, para prevenir la aparición de la obesidad o un trastorno, afección o enfermedad relacionada con la obesidad en sujetos en riesgo de obesidad o el trastorno, afección o enfermedad relacionada con la obesidad.

Como se utiliza en la presente memoria, la forma singular “un”, “una”, y “el”, “la” incluye referencias plurales a menos que se indique lo contrario o lo aclare el contexto. Por ejemplo, como resultará evidente a partir del contexto, “un” agonista de amilina puede incluir uno o más agonistas de amilina.

Como se utiliza en la presente memoria, un “análogo” se refiere a un péptido cuya secuencia se obtuvo de la de un péptido de referencia base, por ejemplo, amilina y calcitonina, e incluye inserciones, sustituciones, extensiones, y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de referencia, por ejemplo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos el 50 o el 55% con el péptido base, en otros casos, por ejemplo, que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos el 70%, 80%, 90%, o 95% con el péptido base. Dichos análogos pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas (incluyendo aminoácidos no naturales y formas L y D). Los análogos incluyen compuestos que tienen actividad agonista y compuestos que tienen actividad antagonista. Los análogos, como se definen en la presente memoria, también incluyen derivados.

Un “derivado” se define como un péptido de referencia o análogos, descritos anteriormente, que tienen una modificación química de uno o más de sus grupos laterales del aminoácido, átomos de carbono  $\alpha$ , grupo amino terminal, o grupo ácido carboxílico terminal. Una modificación química incluye, de manera no limitativa, añadir restos químicos, crear nuevos enlaces, y eliminar restos químicos. Las modificaciones en los grupos laterales del aminoácido incluyen, sin limitación, la acilación de los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, N-alquilación de arginina, histidina, o lisina, la alquilación de los grupos ácido carboxílico glutámico o aspártico, y la desamidación de la glutamina o asparagina. Las modificaciones del amino terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones desamino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior, y N-acilo. Las modificaciones del amino terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones desamino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior, y N-acilo, tales como alquilacilos, alquilacilos ramificados, alquilarilacilos. Las modificaciones del grupo carboxi terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones amida, amida de alquilo inferior, dialquilamida, arilamida, alquilarilamida y éster de alquilo inferior. El alquilo inferior es alquilo C1-C4. Además, puede protegerse uno o más grupos laterales, o grupos terminal, por grupos protectores conocidos para los especialistas en química sintética. El carbono  $\alpha$  de un aminoácido puede mono- o dimetilarse.

En general, con respecto a una secuencia de aminoácidos, el término “modificación” incluye sustituciones, inserciones, elongaciones, deleciones, y derivatizaciones solas o en combinación. Los polipéptidos de la invención pueden incluir una o más modificaciones de un resto aminoacídico “no esencial”. En el contexto de la invención, un resto aminoacídico “no esencial” es un resto que puede alterarse, por ejemplo, deleccionarse o sustituirse, en la nueva secuencia de aminoácidos sin suprimir o reducir sustancialmente la actividad (por ejemplo, la actividad agonista) del polipéptido (por ejemplo, el polipéptido análogo). Los polipéptidos de la invención pueden incluir deleciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos aminoacídicos no esenciales. Los polipéptidos de la invención pueden incluir adiciones de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos sin suprimir o reducir sustancialmente la actividad del polipéptido.

Las sustituciones incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas. Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral o características fisicoquímicas similares (por ejemplo, características electrostáticas, de hidrógeno, de enlace, isotéricas, hidrófobas). Los aminoácidos pueden ser de origen natural o no natural (antinatural). Las familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares son conocidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, metionina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano), cadenas laterales  $\beta$ -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Las sustituciones también pueden incluir cambios no conservativos.

Por “aminoácido” o “resto aminoacídico” se hace referencia a aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y aminoácidos modificados. Salvo que se indique lo contrario, cualquier referencia a un aminoácido, de forma general o específica por el nombre, incluye la referencia tanto a los estereoisómeros tanto D como L si su estructura permite dichas formas estereoisoméricas. Los aminoácidos naturales incluyen alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y valina (Val). Los aminoácidos no naturales incluyen, aunque sin limitación homolisina, homoarginina, homoserina, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoacético, ácido 3-aminoacético, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, terc-butilglicina, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etil-asparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipercolico y tioprolina. Los aminoácidos no naturales adicionales incluyen restos aminoacídicos modificados que están químicamente bloqueados, de forma reversible o irreversible, o modificados químicamente en su grupo amino N-terminal o sus grupos de cadena lateral, como por ejemplo, D y L aminoácidos N-metilados o restos en los que los grupos funcionales de cadena lateral están químicamente modificados en otro grupo funcional. Por ejemplo, los aminoácidos modificados incluyen sulfóxido de metionina; sulfato de metionina; ácido aspártico-(beta-metil éster), un aminoácido modificado de ácido aspártico; N-etilglicina, un aminoácido modificado de glicina; o alanina, carboxamida, un aminoácido modificado de alanina. Se describen restos adicionales que pueden incorporarse en Sandberg *et al.*, J. Med. Chem. 41:2491-91, 1998.

Debe apreciarse que en toda la solicitud las alternativas están escritas en grupos de Markush, por ejemplo, cada posición aminoacídica que contiene más de un posible aminoácido. Se contempla específicamente que cada miembro del grupo de Markush debe considerarse por separado, comprendiendo de este modo otra forma de realización de la invención, y el grupo de Markush no tiene que leerse como una única unidad.

#### 40 Utilizaciones de la invención

En un aspecto general, la invención proporciona la utilización de una combinación de agentes antiobesidad para la preparación de un medicamento para reducir la disponibilidad de nutrientes. Por tanto, la invención proporciona una combinación útil para tratar la obesidad y enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionadas con la obesidad que se beneficiarían de una reducción en la disponibilidad de nutrientes. Dado el aumento en la eficacia cuando se usan en combinaciones, la invención puede permitir la administración de dosificaciones inferiores de uno o más de los agentes antiobesidad usados en combinación en comparación con la utilización del agente solo, tal como en monoterapia.

La invención se basa en la administración de una combinación de agentes antiobesidad. Debe entenderse que la administración de los agentes “en combinación” significa proporcionar cada uno de los agentes a un sujeto que necesita tratamiento. La administración de los agentes podría suceder en forma de una formulación de dosificación farmacéutica única que contiene todos los agentes antiobesidad pretendidos o por separado con cada agente pretendido en su propia formulación de dosificación.

Cuando se usan formulaciones de dosificación diferentes, los agentes antiobesidad individuales pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo, es decir, de forma concurrente, o en momentos escalonados por separado, es decir, secuencialmente antes o después de la administración de otro agente antiobesidad. En algunas formas de realización, la administración en combinación implica la administración de formulaciones de dosificación diferentes durante intervalos solapantes. Por ejemplo, el agente antiobesidad 1 se administra del día 1 al día 30 y el agente antiobesidad 2 se administra del día 20 al día 50. En otras formas de realización, la administración en combinación implica la administración de formulaciones de dosificación diferentes en intervalos secuenciales, no solapantes. Por ejemplo, el agente antiobesidad 1 se administra del día 1 al día 30 y el agente antiobesidad 2 se administra del día 35 al día 50. Por lo tanto debe entenderse que la presente invención incluye todos estos regímenes de tratamientos simultáneos, alternos, o completamente separados durante el transcurso total de tratamiento, y los términos “administración”, “administrar”, “administración en combinación” y “administrar en combinación” tienen que interpretarse de acuerdo con ello.

En algunos casos, la invención aumenta o potencia la eficacia de un agente antiobesidad que tiene eficacia limitada, si la tiene, cuando se utiliza solo (monoterapia). En dichos casos, la invención aumenta o potencia la eficacia de un

## ES 2 325 773 T3

agente antiobesidad, por ejemplo, evitando o retardando la pérdida de eficacia por el uso continuado o aumentando la potencia. Las utilizaciones de acuerdo con la invención pueden permitir la administración de dosificaciones inferiores de uno o más de los agentes antiobesidad usados en combinación en comparación con el uso de cada agente solo.

5 En un aspecto, la invención proporciona un efecto antiobesidad sinérgico entre los agentes administrados. Por consiguiente, en una forma de realización, la administración de una combinación de agentes antiobesidad provoca un efecto, por ejemplo, una reducción en la disponibilidad de nutrientes, la reducción en el peso corporal, la reducción en la ingesta de alimentos, el aumento en el metabolismo, que es mayor que la combinación de los resultados de la administración del agente antiobesidad solo (monoterapia).

10 En otro aspecto de la invención, se reduce o elimina la resistencia de un sujeto a un agente antiobesidad de modo que cuando se administra el agente, será capaz de provocar una respuesta antiobesidad (por ejemplo, reduce la disponibilidad de nutrientes, reduce el peso, reduce la masa grasa). Por ejemplo, y sin el deseo de limitarse por esta o cualquier otra teoría, se propone la teoría de que la resistencia a la leptina puede deberse a los elevados niveles de leptina encontrados en sujetos obesos (es decir, el cuerpo ha llegado a desensibilizarse a la leptina). Por lo tanto, un método de la invención comprende administrar un agente antiobesidad diferente a la leptina (por ejemplo, amilina o un agonista de amilina) para reducir el peso del sujeto para reducir o eliminar la resistencia a la leptina. Una vez se ha conseguido esto, después se tiene que administrar leptina, sola o en combinación con un agente antiobesidad (por ejemplo, amilina o un agonista de amilina), para un efecto antiobesidad adicional. Se contemplan otros medios para reducir el peso para mejorar la resistencia a la leptina, tales como dieta, ejercicio, otros fármacos dietéticos, y dispositivos quirúrgicos.

25 En una forma de realización, la invención permite el suministro del primer agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal para preparar el cuerpo antes de la administración del segundo agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal. En ciertas formas de realización, la administración del primer agente es durante varios días, semanas o incluso meses antes de la administración del segundo agente. En este punto, el segundo agente puede administrarse solo o en combinación con el primer agente. El primer agente antiobesidad es amilina o un agonista de amilina y el segundo agente es una leptina o un agonista de leptina. 30 La concentración sérica de leptina de un sujeto antes de la administración de los agentes antiobesidad es mayor de 10 ng/ml, en otras formas de realización, es mayor de 20 ng/ml.

35 En una forma de realización, tiene que administrarse una amilina o un agonista de amilina al sujeto por lo menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días, 28 días o más antes de la administración de una leptina o agonista de leptina. En algunas formas de realización, antes de la administración de una leptina o un agonista de leptina, tiene que administrarse una amilina o un agonista de amilina al sujeto hasta que la concentración sérica de leptina en el sujeto sea de aproximadamente 4 ng/ml, menos de 4 ng/ml, menos de 2 ng/ml, menos de 1 ng/ml, o menos de aproximadamente 0,5 ng/ml. En algunas formas de realización, tiene que administrarse una leptina o un agonista de leptina en una cantidad de terapia de reemplazo para conseguir concentraciones casi fisiológicas de leptina en el plasma. 40

45 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de una combinación de agentes antiobesidad para la preparación de un medicamento para reducir el riesgo de desarrollar trastornos metabólicos, donde el medicamento tiene que administrarse al sujeto en cantidades eficaces para reducir el peso de un sujeto.

50 En algunas formas de realización de la invención, se usan medicamentos o kits de la invención para aumentar el índice metabólico en un sujeto, disminuir la reducción en el índice metabólico en un sujeto, o conservar el índice metabólico en un sujeto. En una forma de realización, el índice metabólico puede implicar la utilización preferida de la grasa del cuerpo como fuente de energía sobre el tejido corporal magro. En un aspecto, la masa corporal magra no se disminuye después de la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En otro aspecto, se disminuye o previene una reducción en la masa corporal magra después de la administración de la combinación de agentes antiobesidad. Todavía en otro aspecto, se aumenta la masa corporal magra después de la administración de la combinación de agentes antiobesidad. Dicha preferencia por la grasa como fuente de energía puede determinarse comparando la cantidad de tejido graso con tejido corporal magro, averiguado midiendo el peso corporal total y el contenido de 55 grasa al inicio y al final del periodo de tratamiento. Un aumento en el índice metabólico es un nivel mayor del uso de calorías u otra fuente de energía por un sujeto durante un periodo de tiempo en comparación con el nivel de uso de calorías u otra fuente de energía por el sujeto durante otro periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En una forma de realización, el índice metabólico se aumenta por lo menos aproximadamente un 5% en un sujeto, en otras formas de realización, el índice metabólico se aumenta por lo menos aproximadamente un 10%, 15%, 20% 25%, 30%, o 35% en un sujeto en comparación con el nivel de uso de calorías u otra fuente de energía por el sujeto durante otro periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. El aumento en el índice metabólico puede medirse usando un calorímetro respiratorio, por ejemplo. Una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad usados en esta forma de realización es una cantidad de cada agente eficaz para aumentar 65 el índice metabólico en un sujeto cuando se administran en combinación en comparación con un sujeto que recibe los agentes o solamente uno de los agentes.

En otra forma de realización, el medicamento o kit también puede reducir una disminución en el índice metabólico en un sujeto. Dicha disminución en el índice metabólico puede ser el resultado de cualquier régimen de habituación o nutricional o físico que conduzca a una reducción en el índice metabólico, por ejemplo, debido a una dieta reducida en calorías, una dieta restringida, o pérdida de peso. Una dieta restringida incluye racionamientos o prohibiciones, o ambos sobre los tipos de alimento o las cantidades de los alimentos o ambos permitidos en una dieta, basada no necesariamente en las calorías. Por ejemplo, como en dietas individuales, el cuerpo compensa con un índice metabólico reducido sobre la base de la ingesta calórica inferior. En esencia, el cuerpo regula negativamente los requisitos de alimentos, subsistiendo de este modo con menos alimento. Según continúa la dieta, se reduce el umbral para la ingesta calórica. Cuando la dieta ha finalizado, el individuo típicamente gana peso cuando ingiere una dieta normal a causa del umbral de ingesta calórica disminuido y el índice metabólico basal inferior (NIH Technology Assessment Conference Panel (1992) *Ann. Intern. Med.* 116:942-949; Wadden (1993) *Ann. Intern. Med.* 119:688-693). En un aspecto, la pérdida del índice metabólico en un sujeto se reduce, donde la pérdida del índice metabólico es el resultado de una dieta reducida en calorías o pérdida de peso. La reducción en el índice metabólico del sujeto se disminuye en por lo menos aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% en un sujeto. Puede ser deseable formular el medicamento para la administración de la combinación de agentes antiobesidad en el momento en que se inicie el régimen de habituación o nutricional o físico que conduzca a una pérdida o reducción en el índice metabólico. Sin embargo, también se contempla que la administración de los agentes se comience antes de que se inicie el régimen de habituación o nutricional o físico. En un caso, el índice metabólico se mide usando un calorímetro respiratorio. Una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad usados en esta forma de realización es una cantidad de cada agente eficaz para disminuir la reducción del índice metabólico en un sujeto cuando se administran en combinación.

En otro aspecto, se proporcionan utilizaciones y kits para reducir el nivel metabólico, que comprenden la administración de cantidades eficaces de agentes antiobesidad en combinación a un sujeto humano. En una forma de realización, el sujeto está perdiendo peso, o ha perdido peso, por ejemplo, debido a una dieta reducida en calorías, ejercicio aumentado o una combinación de los mismos. Mediante “nivel metabólico” se hace referencia a los intervalos de tiempo de índice metabólico continuo mientras el cuerpo se ajusta a los cambios en el aporte de calorías o energía. Los cambios en el aporte o el gasto calórico pueden ser el resultado de, por ejemplo, dietas reducidas en calorías o actividad física aumentada. Dichos niveles pueden observarse, por ejemplo, durante un régimen de pérdida de peso cuando la pérdida de peso se ralentiza o detiene. En una forma de realización, la utilización y los kits de la presente invención reducen la duración de un nivel metabólico en un sujeto en comparación con la duración de los niveles metabólicos en un sujeto por lo demás idéntico durante el mismo periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En otra forma de realización, las utilizaciones y kits de la presente invención reducen la frecuencia de los niveles metabólicos en comparación con la frecuencia de los niveles metabólicos en un sujeto por lo demás idéntico durante el mismo periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. Todavía en otra forma de realización, la utilización o el kit de la presente invención retarda la aparición de un nivel metabólico en comparación con la aparición de un nivel metabólico en un sujeto por lo demás idéntico durante el mismo periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En una forma de realización, los niveles metabólicos se identifican dibujando un diagrama de los periodos de pérdida de peso reducida o nula. En una forma de realización, está reducido por lo menos un nivel metabólico. En otras formas de realización, están reducidos por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez niveles metabólicos. En otro aspecto, los niveles metabólicos se retardan un día en comparación con un sujeto al que no se ha administrado la combinación de agentes antiobesidad en condiciones idénticas o similares. En otros aspectos, los niveles metabólicos se retardan 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 10 días, 2 semanas o 3 semanas en un sujeto.

Todavía en otra forma de realización, se proporciona una utilización y un kit para conservar el índice metabólico en un sujeto humano. En una forma de realización, el sujeto puede estar en riesgo de perder índice metabólico, por ejemplo, debido al inicio de una dieta reducida en calorías, una dieta restringida, o una pérdida de peso anticipada. La conservación del índice metabólico es el mantenimiento del nivel del uso de calorías u otra fuente de energía por un sujeto durante un periodo de time en comparación con el nivel de uso de calorías u otra fuente de energía por un sujeto por lo demás idéntico durante el mismo periodo de tiempo en condiciones sustancialmente similares o idénticas sin la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En un aspecto, el índice metabólico se mantiene dentro del 15% del índice metabólico del sujeto antes de iniciarse el acontecimiento que provoca la disminución en el índice metabólico. En otros aspectos, el índice metabólico se mantiene dentro del 10%, dentro del 7%, dentro del 5%, dentro del 3% o menos del índice metabólico del sujeto. En un aspecto, la combinación de agentes antiobesidad se administra al inicio de una dieta reducida en calorías, una dieta restringida, o un régimen de ejercicio.

Los índices metabólicos pueden evaluarse usando cualquier método disponible para determinar dichos índices, por ejemplo usando un calorímetro respiratorio. Dichos métodos y dispositivos para evaluar los índices metabólicos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes US n° 4.572.208, 4.856.531, 6.468.222, 6.616.615, 6.013.009, y 6.475.158. Alternativamente, el índice metabólico de un animal puede evaluarse midiendo la cantidad de tejido magro frente al tejido graso catabolizado por el animal después del periodo de dieta. Por tanto, el peso corporal total y el contenido de grasa pueden medirse al final del periodo de dieta. En ratas, un método frecuentemente usado para determinar la grasa corporal total es eliminar quirúrgicamente y pesar almohadilla adiposa retroperitoneal, un cuerpo de grasa localizado en el retroperitoneo, el área entre la pared abdominal posterior y el peritoneo parietal posterior. El peso de la almohadilla se considera directamente relacionado con el porcentaje de grasa corporal del

## ES 2 325 773 T3

animal. Como la relación entre el peso corporal y la grasa corporal en las ratas es lineal, los animales obesos tienen un porcentaje correspondientemente mayor de grasa corporal y peso de la almohadilla adiposa retroperitoneal.

5 En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan usos y kits para reducir la masa grasa aumentando el índice metabólico en un sujeto, donde tiene que administrarse una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para reducir la masa grasa aumentando el índice metabólico del sujeto. La masa grasa puede expresarse como un porcentaje de la masa corporal total. En algunos aspectos, la masa grasa se reduce en por lo menos el 1%, por lo menos el 5%, por lo menos el 10%, por lo menos el 15%, por lo menos el 20%, o por lo menos el 25% durante el transcurso del tratamiento. En un aspecto, la masa magra de sujeto no disminuye durante el transcurso del tratamiento.  
10 En otro aspecto, la masa magra del sujeto se mantiene o aumenta durante el transcurso del tratamiento. En otro aspecto, el sujeto está con una dieta reducida en calorías o una dieta restringida. Mediante “dieta reducida en calorías” se hace referencia a que el sujeto está ingiriendo menos calorías por día en comparación con la dieta normal del mismo sujeto. En un caso, el sujeto está consumiendo por lo menos 50 calorías menos por día. En otros casos, el sujeto está consumiendo por lo menos 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1.000 calorías menos por día.

15 En una forma de realización de la presente invención, se proporciona una utilización o kit para alterar la distribución de grasa en un sujeto en el que tiene que administrarse una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para alterar la distribución de grasa en el sujeto. En un aspecto, la alteración provoca un metabolismo aumentado de grasa visceral o ectópica, o ambas en el sujeto. En algunas formas de realización, el metabolismo de la grasa visceral o ectópica o ambas está a un índice de por lo menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, o 50% mayor que para la grasa subcutánea. En un aspecto, las utilizaciones o kits provocan una distribución de grasa favorable. En una forma de realización, la distribución de grasa favorable está a una proporción aumentada de grasa subcutánea a grasa visceral, grasa ectópica, o ambas. En un aspecto, esto implica un aumento en la masa corporal magra, por ejemplo, como resultado de un aumento en la masa de las células musculares.

25 En otra realización, se proporcionan usos y kits para reducir la cantidad de grasa subcutánea en un sujeto, donde tiene que administrarse a un sujeto que lo necesite, una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para reducir la cantidad de grasa subcutánea en el sujeto. En un caso, se reduce la cantidad de grasa subcutánea en un sujeto en por lo menos aproximadamente el 5%. En otros casos, se reduce la cantidad de grasa subcutánea en por lo menos aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, o 50% en comparación con el sujeto antes de la administración de los agentes antiobesidad.  
30

Las utilizaciones y los kits descritos en la presente memoria pueden usarse para reducir la cantidad de grasa visceral en un sujeto. En un caso, la grasa visceral se reduce en un sujeto en por lo menos aproximadamente el 5%. En otros casos, la grasa visceral se reduce en el sujeto en por lo menos aproximadamente el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, o 50% en comparación con el sujeto antes de la administración de la combinación de agentes antiobesidad. La grasa visceral puede medirse a través de cualquier medio disponible para determinar la cantidad de grasa visceral en un sujeto. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, tomografía abdominal mediante exploración CT y MRI. Se describen otros métodos para determinar la grasa visceral, por ejemplo, en las patentes US n° 6.864.415, 6.850.797, y 6.487.445.  
40

En una forma de realización, se proporciona una utilización o kit para prevenir la acumulación de grasa ectópica o reducir la cantidad de grasa ectópica en un sujeto, donde tiene que administrarse a un sujeto que lo necesite, una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para evitar la acumulación de grasa ectópica o para reducir la cantidad de grasa ectópica en el sujeto. En un caso, la cantidad de grasa ectópica se reduce en un sujeto en por lo menos aproximadamente el 5% en comparación con el sujeto antes de la administración de la combinación de agentes antiobesidad. En otros casos, la cantidad de grasa ectópica se reduce en un sujeto en por lo menos aproximadamente el 10%, o en por lo menos aproximadamente el 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, o 50%. Alternativamente, la cantidad de grasa ectópica se reduce proporcionalmente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con la grasa subcutánea en un sujeto. La grasa ectópica puede medirse en un sujeto usando cualquier método disponible para medir la grasa ectópica.  
50

En otra forma de realización, se proporcionan usos y kits para producir una distribución de la grasa más favorable en un sujeto, en la que tiene que administrarse a un sujeto una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para producir una distribución favorable de la grasa. En una forma de realización, la administración de una combinación de agentes antiobesidad reduce la cantidad de grasa visceral o grasa ectópica, o ambas, en un sujeto.  
55 En una forma de realización, la cantidad de grasa visceral o ectópica, o una combinación de ambas, se reduce preferentemente sobre la reducción en la grasa subcutánea. Esto provoca una mayor proporción de grasa subcutánea a grasa visceral o grasa ectópica. Dichas proporciones mejoradas pueden provocar un riesgo reducido del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, síndrome del ovario poliquístico, síndrome metabólico, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la grasa ectópica o visceral se metaboliza a un índice un 5% mayor que la grasa subcutánea. En otras formas de realización, la grasa ectópica o visceral se metaboliza a un índice por lo menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% mayor que la grasa subcutánea.  
60

Todavía en otro aspecto, tiene que administrarse la cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de agentes antiobesidad en combinación con glucocorticosteroides. Los glucocorticosteroides tienen el efecto adverso de aumentar la masa grasa y disminuir la masa magra. Por consiguiente, se contempla que la combinación de agentes antiobesidad puede usarse junto con glucocorticosteroides en condiciones en que el uso de glucocorticosteroides es beneficioso.  
65

## ES 2 325 773 T3

También se proporcionan usos y kits para reducir el peso en un sujeto con obesidad mórbida reduciendo primero el peso del sujeto a un nivel por debajo del de un obeso mórbido, después administrando al sujeto una combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para reducir adicionalmente el peso del sujeto. Los métodos para reducir el peso de un sujeto hasta por debajo del de la obesidad mórbida incluyen reducir la ingesta calórica, aumentar la actividad física, terapia de fármacos, cirugía bariátrica, tal como cirugía de derivación gástrica, o cualquier combinación de los métodos precedentes. En un aspecto, la administración de la combinación de agentes antiobesidad reduce adicionalmente el peso del sujeto. En otra realización, se proporciona una utilización y kits para reducir el índice de masa corporal en un sujeto que tiene un índice de masa corporal de 40 o menos donde tiene que administrarse la combinación de agentes antiobesidad en cantidades eficaces para reducir adicionalmente el peso del sujeto.

Por reducción del peso se hace referencia a que el sujeto pierde una parte de su peso corporal total durante el transcurso del tratamiento, sea el transcurso del tratamiento de días, semanas, meses o años. Alternativamente, la reducción del peso puede definirse como una disminución en la proporción de la masa grasa a masa magra (en otras palabras, el sujeto ha perdido masa grasa, pero ha mantenido o ganado masa magra, sin necesariamente una pérdida correspondiente en el peso corporal total). Una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad administrados en combinación en esta forma de realización es una cantidad eficaz para reducir el peso corporal de un sujeto durante el transcurso del tratamiento, o alternativamente una cantidad eficaz para reducir el porcentaje de masa grasa del sujeto durante el transcurso del tratamiento. El peso corporal del sujeto se reduce, durante el transcurso del tratamiento, en por lo menos aproximadamente el 10%, en por lo menos aproximadamente el 15%, o en por lo menos aproximadamente el 20%. El porcentaje de masa grasa del sujeto puede reducirse, durante el transcurso del tratamiento, en por lo menos el 1%, por lo menos el 5%, por lo menos el 10%, por lo menos el 15%, por lo menos el 20%, o por lo menos el 25%.

En ciertas formas de realización, para reducir la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, reduciendo el peso, en un sujeto, tiene que administrarse una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad en una dosis en embolada una o más veces al día. Una dosis en embolada es una dosificación intermitente de medicina (en oposición a una infusión continua). A un sujeto se le puede administrar una o más dosis en embolada por día. La dosis en embolada puede ser igual independientemente de cuando se administre al sujeto, o puede ajustarse de modo que se administre al sujeto una dosis en embolada mayor en ciertos momentos del día en comparación con otros. En la administración de un agente en ciertas formulaciones, por ejemplo, formulaciones de liberación sostenida, puede administrarse una dosis en embolada menos frecuentemente, por ejemplo, una vez cada tres días, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes. Además, el tiempo entre dosis en embolada es preferentemente suficientemente largo para permitir que el fármaco administrado en la dosis en embolada previa se elimine del torrente sanguíneo del sujeto.

En otras formas de realización, para reducir la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, reduciendo el peso, tienen que administrarse en un sujeto una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad en dosis continuas. Por dosis continua se pretende indicar la infusión continua del fármaco por, por ejemplo, inyección intravenosa o parche transdérmico. Alternativamente, puede administrarse una dosis continua por vía oral en forma de una cápsula o comprimido de liberación controlada que libera el fármaco en el sistema del sujeto durante un periodo de tiempo. Cuando se administra por una dosis continua, el fármaco se libera durante un periodo de aproximadamente 1 hora, en algunos casos el fármaco se libera durante un periodo de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, o 24 horas.

Por “administrados en combinación” se hace referencia a que los agentes antiobesidad se administran en forma de una única administración, simultáneamente en forma de dosis separadas, o se administran secuencialmente. La administración secuencial se refiere a la administración de uno de los agentes antiobesidad antes o después de un agente antiobesidad. En una forma de realización, el primer agente antiobesidad se administra aproximadamente 30 minutos antes o después del por lo menos otro agente antiobesidad, en otras formas de realización aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 horas antes o después del por lo menos otro agente antiobesidad. Cualquiera de los agentes antiobesidad administrados puede administrarse en forma de una dosis en embolada o en forma de una dosis continua.

La presente invención se refiere además a utilizaciones y kits para aumentar la termogénesis en un sujeto, en la que tiene que administrarse a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas. La termogénesis es el proceso para liberar calorías en forma de calor aumentando el índice metabólico del cuerpo. La termogénesis se activa por mecanismos, incluyendo suplementos, nutrición, ejercicio, y exposición al frío.

La presente invención se refiere asimismo además a utilizaciones y kits para aumentar el metabolismo oxidativo en un sujeto, donde tiene que administrarse a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas. El metabolismo oxidativo es el proceso por el cual se utiliza oxígeno para producir energía a partir de los carbohidratos (azúcares).

En otro aspecto, se proporcionan usos y kits para inducir una sensación de saciedad en un sujeto, en el que tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre

las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

5 En otro aspecto más, se proporciona una utilización o kit para controlar el hambre en un sujeto, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

10 Todavía en otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para prolongar la sensación de saciedad en un sujeto, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

15 En otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para reducir la ingesta calórica reduciendo el tamaño de una comida, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

20 En otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para controlar la ingesta de alimentos, donde tiene que administrarse a dicho sujeto la cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

25 Todavía en otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para asegurar o ayudar a cumplir una dieta reducida en calorías o restrictiva, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

30 En otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para ajustar el punto de referencia de un sujeto de modo que se ajuste la propensión corporal para la homeostasis a un punto de referencia más sano, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas.

35 Todavía en otro aspecto, se proporciona una utilización o kit para mantener la pérdida de peso o para mantener el peso perdido, donde tiene que administrarse a dicho sujeto una cantidad eficaz de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del prosencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas en combinación con la administración de dicho por lo menos un agente antiobesidad que actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos, la modulación del peso corporal, o ambas. En una forma de realización de este aspecto de la invención, la pérdida de peso se mantiene restableciendo el punto de referencia del sujeto.

40 Además, en ciertas formas de realización, la administración de los agentes antiobesidad en combinación provoca un efecto sinérgico en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Además, en ciertas formas de realización, la administración de los agentes antiobesidad en combinación provoca una menor necesidad de dosificación para por lo menos uno de los agentes, con el mismo efecto.

45 En una forma de realización, el contenido de la invención es de utilización en el tratamiento y/o la prevención de afecciones o trastornos metabólicos que se benefician de una reducción en la disponibilidad de nutrientes. Por consiguiente, este contenido puede ser útil en la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir la obesidad, la diabetes (por ejemplo, de tipo 2 o diabetes no insulino-dependiente, diabetes de tipo 1, y diabetes gestacional), trastornos de la alimentación, el síndrome de resistencia a insulina, y enfermedad cardiovascular.

50 En una forma de realización, se proporciona una utilización o kit para alterar la distribución de la grasa, reducir la masa grasa, o ambas en un sujeto. Por consiguiente, los sujetos para los que la alteración de la composición corporal es beneficiosa también pueden beneficiarse de la presente invención. La composición corporal alterada, como se pretende en la presente memoria, incluye la pérdida o mantenimiento de la grasa corporal, con minimización de la pérdida, mantenimiento, o ganancia de masa corporal magra. En dichas situaciones, el peso puede aumentar así como disminuir. Por consiguiente, los sujetos pueden estar delgados, con sobrepeso, u obesidad según se usan estos términos generalmente en la técnica. Las utilidades de la invención también pueden incluir reducir la grasa en tejido

no adiposo manteniendo la masa magra. Las utilizaciones incluyen tratar enfermedades tales como la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) o la lipodistrofia.

5 Los agentes antiobesidad para su utilización en la presente invención incluyen leptina, derivados de leptina, leptina recombinante, y agonistas de leptina. La leptina (derivada del término griego *leptos*, que significa delgado) es una hormona producida predominantemente por las células adiposas. En seres humanos obesos, los niveles sanguíneos de leptina generalmente se correlacionan con la cantidad de grasa almacenada en el cuerpo. Generalmente, cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de leptina. La concentración de los niveles séricos de leptina en la mayoría de los seres humanos con obesidad es elevada, y se piensa que existe un estado de resistencia a la leptina (Mantzoros *et al.* (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:4000-4002). A pesar de los intentos terapéuticos de usar leptina para tratar la obesidad, el efecto de la leptina humana recombinante ha sido limitada, si lo hay, para causar pérdida de peso en individuos obesos. Las excepciones a esto incluyen el tratamiento de individuos con deficiencia congénita de leptina y el tratamiento de individuos con lipoatrofia. Véase, por ejemplo, Heymsfield *et al.* (1999) *JAMA* 282:1568-1575, Farooqi *et al.* (1999) *N. Engl. J. Med.* 341:879-884, y la publicación de patente US nº 2005/0020496.

15 En ciertas formas de realización, la leptina tiene que administrarse en forma de terapia de reemplazo de modo que se consigan concentraciones casi fisiológicas de leptina en el plasma. Se estima que la dosis de reemplazo fisiológico de leptina es de aproximadamente 0,02 mg/kg de peso corporal por día para hombres de todas las edades, de aproximadamente 0,03 mg/kg de peso corporal por día para mujeres de menos de 18 años y de aproximadamente 0,04 mg/kg de peso corporal por día para mujeres adultas. Cuando se intentan conseguir concentraciones casi fisiológicas de leptina, se puede, por ejemplo, tratar a un sujeto con el 50 por ciento de la dosis de reemplazo estimada durante el primer mes de tratamiento, el 100 por cien de la dosis de reemplazo durante el segundo mes de tratamiento, el 200 por ciento de la dosis de reemplazo durante el tercer mes de tratamiento, etc. Los niveles séricos de leptina pueden medirse por métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el uso de inmunoensayos disponibles en el mercado.

25 Un aspecto de la invención es que la grasa se reduce mediante la administración de amilina para tratar la resistencia a la leptina. Una vez se ha mejorado la resistencia a la leptina (disminuido), la leptina puede administrarse para tratar adicionalmente la obesidad.

30 Las proteínas leptina y las composiciones que contienen la proteína leptina apropiadas para las utilizaciones y kits descritos en la presente memoria son conocidas en la técnica e incluyen, de manera no limitativa, leptina humana recombinante (PEG-OD, Hoffman La Roche) y metionil leptina humana recombinante (Amgen). Las proteínas leptina, análogos, derivados, preparaciones, formulaciones, composiciones farmacéuticas, dosis, y vías de administración se han descrito previamente en las siguientes publicaciones de patente de patentes US nº 5.552.524; 5.552.523; 5.552.522; 5.521.283; y las publicaciones de solicitud PCT Nº WO 96/05309, WO 96/40912, WO 97/06816, WO 00/20872, WO 97/18833, WO 97/38014, WO 98/08512, y WO 98/284427.

40 Los agonistas y antagonistas de leptina son conocidos en la técnica y también pueden encontrarse a través de una búsqueda de las bases de datos de patentes. Por ejemplo, se describen agonistas de leptina en las publicaciones de patente US nº 2004/0072219, 2003/049693, 2003/0166847, 2003/0092126, y las patentes US nº 6.777.388 y 6.936.439. Se describen antagonistas de leptina en las publicaciones de patente US nº 2004/0048773, 2002/0160935 y la patente US nº 6.399.745. Se describen medios para ensayar el agonismo o antagonismo de leptina en las patentes US nº 6.007.998 y 5.856.098. Estas patentes son ejemplificativas.

45 Los agentes antiobesidad para su utilización en la presente invención también incluyen amilina y agonistas de amilina. La amilina es una hormona peptídica de 37 aminoácidos que se cosecreta con la insulina a partir de las células pancreáticas beta en respuesta a estímulos de nutrientes. La amilina humana (hAmilina) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

50 Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr (SEC ID Nº 1). La amilina de rata (rAmilina) tiene la siguiente secuencia:

55 KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (SEC ID Nº 2). Está comprendida la utilización de amilinas de cualquier especie.

Se ha descubierto sorprendentemente que la modulación de los niveles eficaces de amilina *in vivo* tal como a través de la utilización de amilina, agonistas de amilina, y antagonistas de amilina, puede modular los niveles eficaces de grelina *in vivo*.

60 Los agonistas de amilina comprendidos en la utilización de la invención incluyen los descritos en las patentes US nº 5.686.411, 6.114.304, y 6.410.511. Dichos compuestos incluyen los que tienen la fórmula I:

65 <sup>1</sup>A<sub>1</sub>-X-Asn-Thr-<sup>5</sup>Ala-Thr-Y-Ala-Thr-<sup>10</sup>Gln-Arg-Leu-B<sub>1</sub>-Asn-<sup>15</sup>Phe-Leu-C<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-E<sub>1</sub>-<sup>20</sup>F<sub>1</sub>-G<sub>1</sub>-Asn-H<sub>1</sub>-Gly-<sup>25</sup>I<sub>1</sub>-J<sub>1</sub>-Leu-K<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-<sup>30</sup>Thr-M<sub>1</sub>-Val-Gly-Ser-<sup>35</sup>Asn-Thr-Tyr-Z (SEC ID Nº 3)

## ES 2 325 773 T3

donde

A<sub>1</sub> es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

5 B<sub>1</sub> es Ala, Ser o Thr;

C<sub>1</sub> es Val, Leu o Ile;

D<sub>1</sub> es His o Arg;

10 E<sub>1</sub> es Ser o Thr;

F<sub>1</sub> es Ser, Thr, Gln o Asn;

15 G<sub>1</sub> es Asn, Gln o His;

H<sub>1</sub> es Phe, Leu o Tyr;

I<sub>1</sub> es Ala o Pro;

20 J<sub>1</sub> es Ile, Val, Ala o Leu;

K<sub>1</sub> es Ser, Pro, Leu, Ile o Thr;

25 L<sub>1</sub> es Ser, Pro o Thr;

M<sub>1</sub> es Asn, Asp, o Gln;

30 X e Y restos aminoacídicos seleccionados independientemente que presentan cadenas laterales que están químicamente unidas entre sí para formar un enlace intramolecular; y

Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxi, ariloxi o aralquiloxi.

35 Las cadenas laterales adecuadas para X e Y incluyen grupos derivados de sulfhidrilos de alquilo que pueden formar enlaces disulfuro; ácidos de alquilo y alquilaminas que pueden formar lactamas cíclicas; alquilaldehídos o haluros de alquilo y alquilaminas que puede condensarse y reducirse para formar un puente alquilamina; o cadenas laterales que pueden conectarse para formar un enlace alquilo, alquenilo, alquinilo, éter o tioéter. Las cadenas alquilo preferidas incluyen grupos alquilo inferior que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a análogos agonistas de la SEC ID N° 3 que no están unidos, y donde X e Y se seleccionan independientemente entre Ala, Ser, Cys, Val, Leu y Ile o ésteres y éteres de alquilo, arilo, o aralquilo de Ser o Cys.

45 Los derivados biológicamente activos de los análogos agonistas anteriores también se incluyen dentro del alcance de esta invención en los que puede invertirse la estereoquímica de los aminoácidos individuales de (L)/S a (D)/R en uno o más sitios específicos.

50 Están asimismo comprendidos dentro del alcance de esta invención los análogos agonistas modificados por glicosilación de restos Asn, Ser y/o Thr.

55 Los análogos agonistas biológicamente activos de amilina se incluyen dentro del alcance de esta invención que contienen menos carácter peptídico. Dichos peptidomiméticos pueden incluir, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones para los enlaces amida --CO-NH--: depsipéptidos (-CO-O-), iminometilenos (-CH<sub>2</sub>-NH-), trans-alquenos (-CH=CH-), beta-enaminonitrilos (--C(=CH-CN)--NH--), tioamidas (-CS--NH-), tiometilenos (-S--CH<sub>2</sub>-- o -CH<sub>2</sub>--S--), metilenos (--CH<sub>2</sub>--C<sub>2</sub>--) y retro-amidas (--NH--CO--).

60 Los compuestos usados en esta invención forman sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos y bases. Dichas sales incluyen sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido canforsulfónico. Las sales preparadas con bases incluyen, por ejemplo, sales de amonio, sales de metales alcalinos (tales como sales de sodio y potasio) y sales de metales alcalino-térreos (tales como sales de calcio y magnesio). Resultan preferidas las sales acetato, clorhidrato, y trifluoroacetato.

65 A lo largo de la presente solicitud, las secuencias de aminoácidos pueden mencionarse como aminoácidos en una posición a, a una posición b adyacente a un péptido de referencia. Por ejemplo, la 1-7 hAmilina se refiere a la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 7, inclusive, de la amilina humana (SEC ID N° 1), el péptido de referencia en este ejemplo. La modificación al péptido de referencia puede mostrarse como la posición de la modificación adyacente a la modificación. Por ejemplo, (2Asp 7Lys) 1-7 hAmilina representa la secuencia de

## ES 2 325 773 T3

aminoácidos en las posiciones 1 a 7 de la amilina humana con una modificación de Cys a Asp en la posición 2 y una modificación de Cys a Lys en la posición 7. Para otro ejemplo, <sup>18</sup>Arg<sup>25,28</sup>Pro-h-amilina representa la secuencia de aminoácidos de amilina humana con una modificación de His a Arg en la posición 18, una modificación de Ala a Pro en la posición 25, y una modificación de Ser a Pro en la posición 28.

5 Los compuestos ejemplificativos incluyen, aunque sin limitación des-<sup>1</sup>Lys-h-amilina (SEC ID N° 4), <sup>28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 5), <sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 6), <sup>18</sup>Arg<sup>25,28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 7), y des-<sup>1</sup>Lys<sup>18</sup>Arg<sup>25,28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 8), que muestran todos actividad amilina *in vivo* en animales de ensayo tratados (por ejemplo, provocando hiperlactemia marcada seguida de hiperglucemia). Además de tener actividades características de la amilina, también se ha descubierto que ciertos compuestos preferidos de la invención tienen características de solubilidad y estabilidad más deseables en comparación con la amilina humana. Los ejemplos de estos compuestos incluyen <sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 9), <sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 10), y <sup>18</sup>Arg<sup>25,28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 7).

15 Otros compuestos incluyen <sup>18</sup>Arg<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 11), des-<sup>1</sup>Lys<sup>18</sup>Arg<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 12), des-<sup>1</sup>Lys<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 13), <sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 14), <sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 15), <sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 16), des-<sup>1</sup>Lys<sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Val<sup>26</sup>Val<sup>28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 17), <sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 18), <sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 19), <sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu<sup>25,28</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 20), <sup>17</sup>Ile<sup>23</sup>Leu<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 21), <sup>17</sup>Ile<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 22), des-<sup>1</sup>Lys<sup>17</sup>Ile<sup>23</sup>Leu<sup>25,28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 23), <sup>17</sup>Ile<sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu-h-amilina (SEC ID N° 24), <sup>17</sup>Ile<sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu<sup>26</sup>Val<sup>29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 25), <sup>17</sup>Ile<sup>18</sup>Arg<sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Val<sup>28,29</sup>Pro-h-amilina (SEC ID N° 26), <sup>13</sup>Thr<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>26</sup>Ala<sup>28</sup>Leu<sup>29</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 27), <sup>13</sup>Thr<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>26</sup>Ala<sup>29</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 28), des-<sup>1</sup>Lys<sup>13</sup>Thr<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>26</sup>Ala<sup>28</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 29), <sup>13</sup>Thr<sup>18</sup>Arg<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>26</sup>Ala<sup>29</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 30), <sup>13</sup>Thr<sup>18</sup>Arg<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>28,29</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 31), y <sup>13</sup>Thr<sup>18</sup>Arg<sup>21</sup>His<sup>23</sup>Leu<sup>25</sup>Pro<sup>26</sup>Ala<sup>28,29</sup>Pro<sup>31</sup>Asp-h-amilina (SEC ID N° 32).

Los análogos agonistas de amilina útiles incluyen los identificados en la publicación de solicitud PCT N° WO 93/10146.

30 Los agonistas de amilina útiles en la invención también pueden incluir fragmentos de amilina y sus análogos que se ha descrito anteriormente así como los descritos en el documento EP 289287. Los agonistas de amilina también pueden ser compuestos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 99% con la SEC ID N° 1 que tienen actividad amilina. Los agonistas de amilina también incluyen moléculas pequeñas, moléculas no peptídicas, por ejemplo, las basadas en química de moléculas pequeñas. "Actividad amilina" como se utiliza en este documento incluye la capacidad de la amilina de afectar a los niveles de grelina en un cuerpo. Los agonistas de amilina también incluyen análogos de amilina que tienen inserciones, deleciones, extensiones y/o sustituciones en por lo menos una o más posiciones aminoácídicas de la SEC ID N° 1. La cantidad de inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos puede ser de no más de 5, 10, 15, 20, 25, o 30. Las inserciones, extensiones, o sustituciones pueden ser con otros aminoácidos naturales, aminoácidos sintéticos, peptidomiméticos, u otros compuestos químicos. Los agonistas de amilina, según se contempla en la invención también pueden ser calcitoninas, tales como calcitoninas de teleosteo, y sus análogos, así como péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (CGRP) y sus análogos.

45 Los agonistas de amilina también incluyen polipéptidos (mencionados en la presente memoria como péptidos LHC (bucle hélice C-terminal)) descritos en la solicitud de patente US n° 60/543.275 y en la solicitud PCT N° PCT/US2005/004631, presentada el 11 de febrero de 2005, así como sus análogos y derivados. Los péptidos LHC para su utilización en la invención actúan como un agonista para por lo menos un efecto biológico de la calcitonina, amilina, CGRP, o cualquier combinación de los tres descritos en la presente memoria o que se une a por lo menos uno de los receptores de amilina, calcitonina, o CGRP. La actividad de unión al receptor y la actividad biológica de péptidos LHC ejemplares se describen en la solicitud de patente US n° 60/543.275 y en la solicitud PCT N° PCT/US2005/004631. En un aspecto general, estos agonistas polipeptídicos tienen por lo menos una región de bucle de amilina o calcitonina y análogos de las mismas, una región de hélice  $\alpha$  de por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogos de la misma o una región de hélice  $\alpha$  que tiene una parte de una región de hélice  $\alpha$  de y una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o sus análogos respectivos, y una cola C-terminal de amilina o calcitonina o análogos de las mismas, con la condición de que la cola C-terminal de la calcitonina o un análogo de calcitonina no sea prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp), homoserina (Hse) o derivados de Hse.

60 En determinadas formas de realización, estos péptidos LHC tienen una región de bucle de amilina o análogo de amilina, por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina, y una cola C-terminal de amilina o análogo de amilina. En otras formas de realización, estos péptidos LHC tienen una región de bucle de calcitonina o análogo de calcitonina, por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina, y una cola C-terminal de amilina o análogo de amilina. Todavía en otras formas de realización, estos péptidos LHC tienen una región de bucle de amilina o análogo de amilina, por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de amilina o análogo de amilina y por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina, y una cola C-terminal de amilina o análogo de amilina. Todavía en otras formas de realización, estos péptidos LHC tienen una región de bucle de calcitonina o análogo de calcitonina, por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de amilina o análogo de amilina y por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina, y una cola C-terminal de amilina o análogo de amilina. Todavía en otras formas de realización,

estos péptidos LHC tienen una región de bucle de amilina o análogo de amilina, una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina o por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de amilina o análogo de amilina y por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina, y una cola C-terminal de calcitonina o análogo de calcitonina.

En ciertas formas de realización, la región de bucle de estos péptidos LHC puede comprender adicionalmente no más de una, dos, tres, o cuatro modificaciones que incluyen sustituciones, inserciones, o deleciones del bucle de amilina o calcitonina, y análogos de las mismas. Se contempla adicionalmente que estos péptidos LHC pueden tener modificaciones adicionales en la parte N-terminal del bucle que comprende una región N-cap (capucha N), que puede tener características hidrófobas o hidrófilas tales como acetilo, isocaproílo, ácido 3,6-dioxiocetanoico, o ácido 1-amino-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina succinímico. Las modificaciones pueden incluir adicionalmente uno, dos, tres o más aminoácidos adicionales. Ésta es un área que permite muchas modificaciones demasiado numerosas para su mención, pero que resultarían evidentes para un experto en la materia sobre la base de lo que se ejemplifica adicionalmente en la presente solicitud.

Estos péptidos LHC también pueden derivarse adicionalmente por alteraciones químicas tales como amidación, glicosilación, acilación, sulfatación, fosforilación, acetilación, y ciclación. Dichas alteraciones químicas pueden obtenerse a través de metodologías químicas o bioquímicas, así como a través de procesos *in vivo*, o cualquier combinación de los mismos. Los derivados de estos péptidos LHC también pueden incluir la conjugación con uno o más polímeros o sustituyentes de molécula pequeña. Un tipo de conjugación polimérica es el enlace o la unión de polímeros de polietilenglicol ("PEG"), poliaminoácidos (por ejemplo, poli-his, poli-arg, poli-lys, etc.) y/o cadenas de ácido graso de diversas longitudes en el extremo N- o C-terminal o cadenas laterales de restos aminoacídicos del polipéptido. Los sustituyentes de molécula pequeña incluyen alquilos cortos y alquilos forzados (por ejemplo, ramificados, cíclicos, condensados, adamantilo), y grupos aromáticos. Además, pueden remplazarse restos básicos tales como R y K con homoR y homoK, citrulina, u ornitina para mejorar la estabilidad metabólica del péptido. Los polipéptidos para su utilización en la invención incluyen formas ácidas así como de amida.

En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  de los péptidos LHC comprende por lo menos cuatro aminoácidos consecutivos de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina. En otra forma de realización, la región de hélice  $\alpha$  comprende por lo menos 5, 6, 7, u 8 aminoácidos consecutivos de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina. En otras formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  comprende por lo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más aminoácidos consecutivos de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina. En ciertas formas de realización, cuando la cantidad de aminoácidos consecutivos es inferior a 8, se contempla que la región de hélice  $\alpha$  comprende adicionalmente por lo menos 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, o más aminoácidos consecutivos de una región de hélice  $\alpha$  de amilina o análogo de amilina. En ciertas formas de realización, cuantos menos aminoácidos de calcitonina o análogo de calcitonina, más aminoácidos de una amilina o análogo de amilina pueden encontrarse en la región de hélice  $\alpha$  de los nuevos compuestos. La cantidad de aminoácidos que comprende la región de hélice  $\alpha$  puede ser de aproximadamente 10 a 23 aminoácidos. Por consiguiente, la región de hélice  $\alpha$  puede ser de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 aminoácidos de longitud. Además, los aminoácidos deben proporcionar de aproximadamente tres a aproximadamente seis giros de hélice  $\alpha$ . Se contempla adicionalmente que la región de hélice  $\alpha$  de los compuestos puede comprender adicionalmente no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez modificaciones que incluyen sustituciones, inserciones, o deleciones a partir de la región de hélice  $\alpha$  de calcitonina, y/o amilina, y análogos de las mismas.

En ciertas formas de realización, la cola C-terminal de los péptidos LHC comprende por lo menos los seis, cinco, o cuatro últimos aminoácidos de amilina o calcitonina, y los análogos de las mismas. En ciertas formas de realización, la cola C-terminal de los nuevos compuestos comprende por lo menos una parte del extremo C-terminal que tiene un giro  $\beta$ . En ciertas formas de realización, el giro  $\beta$  se introduce por la combinación de aminoácidos de Gly-Ser. Por consiguiente, los péptidos LHC pueden tener un extremo C-terminal que comprende una parte de una cola C-terminal de amilina o calcitonina (y análogos de las mismas) que tiene Gly-Ser o comienza en Gly-Ser.

En ciertas formas de realización, la cola C-terminal de los péptidos LHC puede comprender adicionalmente no más de una, dos, o tres modificaciones que incluyen sustituciones, inserciones, o deleciones del bucle de amilina o calcitonina, y análogos de las mismas. Se contempla adicionalmente que los péptidos LHC pueden tener modificaciones adicionales en la parte C-terminal de la cola C-terminal que pueden incluir, por ejemplo, L-octilglicina, 4ABU (ácido 4-aminobutírico), 9Anc (ácido 9 amiononanoico), ácido 3,6-dioxiocetanoico o ácido 1-amino-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina succinímico. La modificación puede incluir adicionalmente uno, dos, tres o más aminoácidos adicionales. Los tipos de modificación contemplados en esta área resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de lo ejemplificado adicionalmente en la presente solicitud.

En un aspecto, una región de bucle se define como la región encontrada en el extremo N-terminal que comprende de por lo menos 5 a 8 aminoácidos, donde el primer y el último aminoácidos pueden crear un enlace, por ejemplo, los restos en las posiciones 2-7 de la amilina o los restos en las posiciones 1-7 de la calcitonina y sus regiones correspondientes en sus análogos respectivos. En otro aspecto, una región de hélice  $\alpha$  se define como la parte interna de la amilina o calcitonina flanqueada por la región de bucle y la cola C-terminal que forma estructuralmente una hélice  $\alpha$ , por ejemplo, los restos en las posiciones 8-23 de la amilina o los restos en las posiciones 8-27 de la calcitonina y sus regiones correspondientes en sus análogos respectivos. Todavía en otro aspecto, una cola C-terminal se define como la región después de la hélice  $\alpha$ , por ejemplo, los restos en las posiciones 33-37 de la amilina o una región más larga

## ES 2 325 773 T3

como los restos en las posiciones 27-37 o los restos en las posiciones 27 ó 28 a 32 de la calcitonina. Se incluyen en los péptidos LHC las formas tanto amida como ácida de los compuestos descritos.

5 La amilina y la calcitonina, como se definen en la presente memoria, incluyen todas las variaciones nativas y de especie. Los ejemplos de amilina y calcitonina incluyen, aunque sin limitación: amilina humana (SEC ID N° 1), amilina de rata (SEC ID N° 2), calcitonina de salmón (sCT) CSNLSTCVLGLKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP (SEC ID N° 33), y calcitonina humana (hCT) CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVVGAP (SEC ID N° 34).

10 En un aspecto general, los péptidos LHC comprenden por lo menos una región de bucle, una región de hélice  $\alpha$ , y una cola C-terminal. La región de bucle comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la fórmula (II) X-secuencia Xaa1-Y donde X e Y pueden crear un enlace y son restos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que se unen, o pueden unirse, químicamente entre sí para formar un enlace intramolecular tal como, por ejemplo, un enlace disulfuro; un enlace amida; formar una lactama cíclica, por ejemplo, por un ácido de alquilo y una alquilamina; formar una alquilamina o puente imina, por ejemplo, por condensación y reducción de alquilaldehydos o haluros de alquilo y alquilaminas; y formar un enlace alquilo, alqueno, alquino, éter o tioéter, por ejemplo, por conexión de cadenas laterales. Las cadenas alquilo pueden incluir grupos alquilo inferior que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. En ciertas formas de realización, el enlace intramolecular puede ser un enlace disulfuro, amida, imina, amina, alquilo y alqueno. En ciertas formas de realización, X e Y en la fórmula (II) se seleccionan independientemente entre Ser, Asp, Glu, Lys, Orn (ornitina), o Cys. En ciertas formas de realización, X e Y en la fórmula (II) son Cys y Cys. En otras formas de realización, X e Y en la fórmula (II) son Ser y Ser. Todavía en otras formas de realización, X e Y en la fórmula (II) son Asp y Lys o Lys y Asp.

15 La secuencia Xaa1 en la fórmula (II) comprende una secuencia de aminoácidos de 3, 4, 5 ó 6 aminoácidos entre X e Y. En ciertas formas de realización, la secuencia Xaa1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una región con uno o más restos que contienen hidroxilo sustituidos o sin sustituir en las proximidades a Y. Por ejemplo, la región de restos que contienen hidroxilo puede tener por lo menos 2 de los 3 aminoácidos adyacentes a Y que son una Ser o Thr. Los otros aminoácidos en la secuencia Xaa1 pueden ser cualquier aminoácido. En ciertas formas de realización, la secuencia Xaa1 es de 3 aminoácidos. En otras formas de realización, la secuencia Xaa1 es de 4 aminoácidos. Todavía en otras formas de realización, la secuencia Xaa1 es de 5 aminoácidos. Todavía en otras formas de realización, la secuencia Xaa1 es de 6 aminoácidos. Por consiguiente, Xaa1 en la fórmula (II) puede representarse por Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7 (SEC ID N° 35). En ciertas formas de realización, puede estar ausente Xaa2, Xaa3, Xaa4, dos cualquiera de ellas, o las tres. En ciertas formas de realización, Xaa5, Xaa6, y Xaa7 comprenden una región de restos que contienen hidroxilo. Propiamente dicho, por lo menos dos de los tres aminoácidos pueden ser una Ser, Hse, Thr, alo-Treonina (aloThr), d-Treonina (d-Thr), u otro análogo no natural de la misma. Xaa2 puede ser cualquier aminoácido o estar ausente, Xaa3 puede ser cualquier aminoácido o estar ausente, Xaa4 puede ser cualquier aminoácido o estar ausente, Xaa5 puede ser cualquier aminoácido si Xaa6 es una Ser o Thr y Xaa7 es una Ser o Thr, Xaa6 puede ser cualquier aminoácido si Xaa5 es una Ser o Thr y Xaa7 es una Ser o Thr, Xaa7 puede ser cualquier aminoácido si Xaa5 es Ser o Thr y Xaa6 es Ser o Thr. Por consiguiente, en cierta realización, Xaa1 puede representarse como Xaa2 ausente, Xaa3 es Ala, Gly, Ser, Asp o está ausente, Xaa4 es Asn, Ala, Asp, Gly o está ausente; Xaa5 es Ala, Leu, Thr, o Ser; Xaa6 es Ala, Ser, o Thr; y Xaa7 es Ala, Ser, Val, Hse, ácido (S)-2-amino-3-hidroxi-metilbutanoico (Ahb), ácido (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-metilpentanoico (Ahp), d-Thr, Thr, o un derivado de la misma. En otras formas de realización Xaa1 puede representarse como Xaa2 ausente, Xaa3 es Ser, Gly, o está ausente, Xaa4 es Asn o Asp, Xaa5 es Ala, Ser, Thr o Leu, Xaa6 es Ala, Thr o Ser, y Xaa7 es Ser, d-Thr, aloThr o Thr. En ciertas formas de realización, la región de bucle en la fórmula (II) comprende las representaciones descritas anteriormente de Xaa1 en la que Xaa3 es Ala, en la que Xaa3 es Ser o en la que Xaa3 es Gly. Alternativa o adicionalmente, la región de bucle comprende las representaciones descritas anteriormente de Xaa1 en la que Xaa4 es Ala, en la que Xaa4 es Asn, en la que Xaa4 es Asp, o en la que Xaa4 es Gly. Alternativa o adicionalmente, la región de bucle comprende las representaciones descritas anteriormente de Xaa1 en la que Xaa5 es Ala, en la que Xaa5 es Thr, o en la que Xaa5 es Leu. Alternativa o adicionalmente, la región de bucle comprende las representaciones descritas anteriormente de Xaa1 en la que Xaa6 es Ser o en la que Xaa6 es Ala. Alternativa o adicionalmente, la región de bucle comprende las representaciones descritas anteriormente de Xaa1 en la que Xaa7 es Thr o en la que Xaa7 es d-Thr. Se contempla adicionalmente que pueden hacerse no más de una, dos, o tres modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones a la región de bucle.

55 Los ejemplos de la región de bucle de la invención incluyen, de manera no limitativa, CNTATC (SEC ID N° 36); CATATC (SEC ID N° 37); CDTATC (SEC ID N° 38); CGTATC (SEC ID N° 39); CNAATC (SEC ID N° 40); CNTSTC (SEC ID N° 41); CNTA-dThr-C (SEC ID N° 42); CNTA-T(OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-C (SEC ID N° 43); CNTASC (SEC ID N° 44); CNTAAC (SEC ID N° 45); CNTAVC (SEC ID N° 46); CNTA-Hse-C (SEC ID N° 47); CNTA-Ahb-C (SEC ID N° 48); CNTA-Ahp-C (SEC ID N° 49); CSNLSTC (SEC ID N° 50); CGNLSTC (SEC ID N° 51); CANLSTC (SEC ID N° 52); CSALSTC (SEC ID N° 53); CSNASTC (SEC ID N° 54); CSNLATC (SEC ID N° 55); y CSNLSAC (SEC ID N° 56). Como se ha indicado previamente, se contempla adicionalmente que pueden introducirse no más de una, dos, o tres modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones a la región de bucle.

65 La región de bucle de los péptidos LHC puede comprender adicionalmente modificaciones o aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Dichas modificaciones incluyen la adición de compuestos tales como Lys, Ala, Phe, Ile, Ser, Octilglicina, Isocap, Fmoc-ácido 3,6-dioxioctanoico, Fmoc-ácido 1-amino-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina succinímico, acetilo, y/o grupos para la solubilidad, suministro, señalización. Los bucles modificados ejemplificativos incluyen la adición de Lys a la secuencia de Xaa1 o la adición de Ile a la secuencia de Xaa1. Por ejemplo, la región

## ES 2 325 773 T3

de bucle modificada puede ser KCNTATC (SEC ID N° 57). En ciertas formas de realización, las adiciones y/o modificaciones en el extremo N-terminal de la región de bucle pueden cambiar la región de bucle. Por ejemplo, la región de bucle puede modificarse del siguiente modo: ciclo(2,7) 1-7 hAmilina, ciclo(<sup>2</sup>Asp<sup>7</sup>Lys) 1-7 hAmilina, N-isocaproil 1-7 hAmilina, N-3,6 dioxaoctanoil 1-7 hAmilina, L-Octilglicina 1-7 hAmilina, Acetil (<sup>2</sup>Agy, <sup>7</sup>Agy) 1-7 hAmilina donde  
5 Agy es Alilglicina, Acetil (<sup>1</sup>Ala) 1-7 hAmilina, (<sup>1</sup>Thr<sup>3</sup>Asp) 1-7 hAmilina, Isocap (<sup>7</sup>Ala) 5-7 sCT, Acetil (<sup>2</sup>Agy, <sup>7</sup>Agy) 1-7 sCT, y ciclo (1,7 (<sup>1</sup>Asp <sup>7</sup>Lys) 1-7 sCT. Por lo tanto, considerando el ejemplo de Isocap (<sup>7</sup>Ala) 5-7 sCT, ciertas formas de realización comprenden modificaciones en la región N-terminal de la región de bucle de tal modo que los aminoácidos Xaa2 a Xaa5 estén ausentes.

10 La región de hélice  $\alpha$  de los péptidos LHC puede ser de aproximadamente 8 a 23 aminoácidos de longitud. En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  es anfipática. En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  comprende de aproximadamente 3 a 6 giros de hélice. En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  comprende 3, 4, 5 ó 6 giros de hélice. En otras formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  es una estructura rígida equivalente a aproximadamente 3, 4, 5 ó 6 giros de hélice. Un ejemplo de una hélice idealizada es LLQLQKLLQKQY  
15 (SEC ID N° 58). En ciertas formas de realización, la hélice  $\alpha$  es una estructura antipática. Por consiguiente, pueden seleccionarse las características de los aminoácidos deseables que proporcionarían este tipo de estructura.

Se ha descubierto que la región de hélice  $\alpha$  de la calcitonina, una combinación de una región de hélice  $\alpha$  de amilina y calcitonina, o partes de las mismas, y/o algunos elementos CGRP son deseables en la región de hélice  $\alpha$  de los péptidos LHC. Se contempla que, como con la región de bucle, la región de hélice  $\alpha$  puede ser de cualquier amilina o calcitonina, y análogos de las mismas. Por consiguiente, en ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  es por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de una calcitonina o análogo de calcitonina. En otras formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  es por lo menos una parte de una región de hélice  $\alpha$  de una calcitonina o análogo de calcitonina y por lo menos una parte de una hélice  $\alpha$  de una amilina o análogo de amilina. Todavía en otras formas de  
25 realización, la región de hélice  $\alpha$  de los péptidos LHC contiene elementos de CGRP. Se contempla adicionalmente que compuestos nuevos puede tener no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez modificaciones adicionales tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones.

En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  del LHC puede comprender una región de hélice  $\alpha$  de tipo I. Una región de hélice  $\alpha$  de tipo I comprende los aminoácidos desde la posición 8 de sCT hasta la posición 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, o 27 de sCT. Además, la región de hélice  $\alpha$  de tipo I puede comprender más de una parte de una región de hélice  $\alpha$  de calcitonina o análogo de calcitonina de la misma o diferente especie, por ejemplo 8-21 sCT 19-27 sCT; 8-21 sCT 18-27 sCT; o 8-16 hCT 17-27 sCT; o (<sup>11</sup>Arg) 8-16 hCT (<sup>18</sup>Arg) 17-27 sCT. Alternativamente o adicionalmente, la hélice  $\alpha$  descrita anteriormente de 8-18 sCT a 8-27 sCT puede comprender adicionalmente las  
35 sustituciones de uno o más de (<sup>10</sup>Aib), (<sup>11</sup>Arg), (<sup>11</sup>Orn), (<sup>11</sup>hArg), (<sup>11</sup>Cit), (<sup>11</sup>hLys), (<sup>11</sup>Lys(for)), (<sup>17</sup>Aib), (<sup>18</sup>Arg), (<sup>18</sup>Orn), (<sup>18</sup>Arg), (<sup>18</sup>Cit), (<sup>18</sup>hLys), (<sup>18</sup>Lys(for)), (<sup>18</sup>Lys(PEG5000)), (<sup>22</sup>Leu), (<sup>24</sup>Pro) o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización, una región de hélice  $\alpha$  de tipo I de los péptidos LHC puede representarse por: XI V L Xaa10 Xaa11 LS Q Xaa15 L Xaa17 Xaa18 LQ T Xaa22 P Xaa24 T N T XI (SEC ID N° 59), donde

40 Xaa10 es Gly o Aib;

Xaa11 es Lys, Arg, Orn, hArg, Cit, hLys, o Lys(for);

45 Xaa15 es Glu o Phe;

Xaa17 es His o Aib;

Xaa18 es Lys, Arg, Orn, hArg, Cit, hLys, Lys(for), Lys(PEG 5000);

50 Xaa22 es Tyr o Leu;

Xaa24 es Arg o Pro; o

55 XI está ausente o comprende 1-4 aminoácidos adicionales.

Debe recordarse que cada miembro del grupo de Markush, o una combinación de los mismos, es otra forma de realización de la invención y no debe considerarse como una unidad única. Este es un método abreviado para indicar, como un ejemplo, fórmulas de formas de realización de los péptidos LHC que incluyen una región de hélice  $\alpha$  de tipo I en las que, Xaa18 puede ser una Lys, Arg, Orn, hArg, Cit, hLys, o Lys(for), y cada variación es una forma de realización diferente de la invención. Por consiguiente, la fórmula de la región de hélice  $\alpha$  de tipo I tiene una forma de realización en la que Xaa18 es Lys. Existe otra forma de realización en la que Xaa18 es Arg, y etc. Se contempla adicionalmente que la región de hélice  $\alpha$  puede contener no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones. Por consiguiente,  
65 los compuestos de una región de hélice  $\alpha$  de tipo I pueden tener deleciones adicionales en el extremo C-terminal. En ciertas formas de realización, los aminoácidos de XI pueden formar un giro de hélice  $\alpha$ .

## ES 2 325 773 T3

Los ejemplos de una región de hélice  $\alpha$  de tipo I de los péptidos LHC incluyen, de manera no limitativa, 8-18 sCT, 8-21 sCT, 8-24 sCT, 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg) 8-18 sCT, (<sup>18</sup>Arg) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Orn <sup>18</sup>Orn) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Cit) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>hArg <sup>18</sup>hArg) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Orn) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Arg) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Cit) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>hLys <sup>18</sup>hLys) 8-18 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Arg <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Arg) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Lys(for) <sup>18</sup>Lys(for)) 8-18-sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Lys(for) <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Lys(for)) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Lys(PEG 5000)) 8-18 sCT, (<sup>11</sup>Arg) 8-21 sCT, (<sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Orn <sup>18</sup>Orn) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Cit) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>hArg <sup>18</sup>hArg) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Orn) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Cit) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>hLys <sup>18</sup>hLys) 8-21 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Arg <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Lys(for) <sup>18</sup>Lys(for)) 8-21 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Lys(for) <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Lys(for)) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Lys(PEG 5000)) 8-21 sCT, (<sup>11</sup>Arg) 8-24 sCT, (<sup>18</sup>Arg) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg <sup>22</sup>Leu) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg <sup>24</sup>Pro) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Orn <sup>18</sup>Orn) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Cit) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>hArg <sup>18</sup>hArg) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Orn) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Arg) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Cit) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>hLys <sup>18</sup>hLys) 8-24 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Arg <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Arg) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Lys(for) <sup>18</sup>Lys(for)) 8-24 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Lys(for) <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Lys(for)) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Lys(PEG 5000)) 8-24 sCT, (<sup>11</sup>Arg) 8-27 sCT, (<sup>18</sup>Arg) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg <sup>22</sup>Leu) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg <sup>24</sup>Pro) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Orn <sup>18</sup>Orn) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Cit) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>hArg <sup>18</sup>hArg) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Orn) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Orn) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Arg) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Cit <sup>18</sup>Cit) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>hLys <sup>18</sup>hLys) 8-27 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Arg <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Arg) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Lys(for) <sup>18</sup>Lys(for)) 8-27 sCT, (<sup>10</sup>Aib <sup>11</sup>Lys(for) <sup>17</sup>Aib <sup>18</sup>Lys(for)) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Lys(PEG 5000)) 8-27 sCT, (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT-19-27 sCT, y (<sup>11</sup>Arg <sup>18</sup>Arg) 8-21 sCT-(<sup>18</sup>Leu) 18-27 sCT.

En ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  de los péptidos LHC puede comprender una región de hélice  $\alpha$  de tipo II. Una región de hélice  $\alpha$  de tipo II comprende una parte de una región hélice  $\alpha$  de una amilina o análogo de amilina y una parte de una región de una hélice  $\alpha$  de una calcitonina o análogo de calcitonina. La región de hélice  $\alpha$  de tipo II puede comprender los aminoácidos de la posición 8 de hAmilina a 11, 12, 13,14, 15, 16, 17, 18 ó 19 de hAmilina y los aminoácidos de la posición 13, 14, 15, 16, 17,18, y 19 de sCT a la posición 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ó 27 de sCT. Alternativa o adicionalmente, la región de hélice  $\alpha$  descrita anteriormente de amilina y calcitonina puede comprender adicionalmente las sustituciones de una o más de (<sup>8</sup>Val), (<sup>9</sup>Leu), (<sup>9</sup>Met), (<sup>10</sup>Gly), (<sup>10</sup>His), (<sup>12</sup>Thr), (<sup>13</sup>Thr), (<sup>13</sup>Asn), (<sup>13</sup>Phe), (<sup>13</sup>Tyr), (<sup>14</sup>Arg), (<sup>14</sup>Ala), (<sup>14</sup>Asp), (<sup>14</sup>Glu), (<sup>14</sup>Gln), (<sup>14</sup>Thr), (<sup>14</sup>Gly), (<sup>15</sup>Leu), (<sup>15</sup>Ser), (<sup>15</sup>Glu), (<sup>15</sup>Ala), (<sup>15</sup>Tyr), (<sup>16</sup>Asp), (<sup>17</sup>Phe), (<sup>18</sup>Arg), (<sup>17</sup>Aib), (<sup>18</sup>Arg), (<sup>18</sup>Orn), (<sup>18</sup>hArg), (<sup>18</sup>Cit), (<sup>18</sup>hLys), (<sup>18</sup>Lys(for)), (<sup>18</sup>Lys(PEG5000)), (<sup>19</sup>Phe), (<sup>20</sup>His), (<sup>21</sup>Asn), (<sup>22</sup>Met), (<sup>22</sup>Val), (<sup>22</sup>Phe), (<sup>22</sup>Leu), (<sup>24</sup>Pro), o cualquier combinación de las mismas. En ciertas formas de realización, la cantidad de aminoácidos en la región de hélice  $\alpha$  de tipo II de los péptidos LHC es por lo menos de 10 aminoácidos. En otras formas de realización, la cantidad de aminoácidos en la región de hélice  $\alpha$  de tipo II de los péptidos LHC es de 11,12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23. En otras formas de realización, la cantidad de aminoácidos en la región de hélice  $\alpha$  de tipo II de los péptidos LHC es de 24 o más.

En una forma de realización, una región de hélice  $\alpha$  de tipo II de los péptidos LHC puede representarse por: XI Xaa8 Xaa9 Xaa10 R Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 P Xaa24 T N T XI (SEC ID N° 60) donde

- Xaa8 es Ala o Val;
  - Xaa9 es Thr, Met o Leu;
  - Xaa10 es Gln, Gly, His;
  - Xaa12 es Leu, o Thr;
  - Xaa13 es Ala, Thr, Asn, Phe, Tyr, Ser, o Thr;
  - Xaa14 es Asn, Arg, Ala, Asp, Glu, Gln, Thr, o Gly;
  - Xaa15 es Phe, Leu, Ser, Glu, Ala, Asp, o Tyr;
  - Xaa16 es Leu o Asp;
  - Xaa17 es Val, His, Ser, Phe, o Aib;
  - Xaa18 es His, Arg, Lys, Orn, hArg, Cit, hLys, Lys(for), o Lys(PEG5000);
  - Xaa19 es Leu, Ser o Phe;
  - Xaa20 es Gln o His;
  - Xaa21 es Thr o Asn;
  - Xaa22 es Tyr, Val, Phe, Leu o Met;
  - Xaa24 es Arg o Pro; y
- XI está ausente o comprende 1-4 aminoácidos adicionales.

## ES 2 325 773 T3

De nuevo, cada miembro en el grupo de Markush, o una combinación de los mismos, es otra forma de realización de la invención y no tiene que leerse como una única unidad. Se contempla adicionalmente que la región de hélice  $\alpha$  de tipo II puede contener no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones de los compuestos descritos en la presente memoria.

5 Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la región de hélice  $\alpha$  de tipo II puede tener deleciones en el extremo C-terminal que provocan la deleción de la posición 27, 26, 25, 24, o 22. En otras formas de realización, sin embargo, las deleciones no eliminan los aminoácidos de las posiciones 19, 20, 21 ó 22.

Los ejemplos de una región de hélice  $\alpha$  de tipo II de los péptidos LHC incluyen, de manera no limitativa, (<sup>8</sup>Val <sup>9</sup>Leu <sup>10</sup>Gly) 11-15 hAmilina 16-27 sCT, (<sup>8</sup>Val<sup>19</sup>Leu<sup>10</sup>Gly) 11-15 hAmilina (<sup>18</sup>Arg) 16-27 sCT, 8-12 hAmilina (<sup>18</sup>Arg) 13-27 sCT, 8-18 hAmilina 19-23 sCT, 8-18 hAmilina 19-27 sCT, (<sup>15</sup>Glu, <sup>18</sup>Arg) 8-18 hAmilina 19-24 sCT, (<sup>14</sup>Arg <sup>15</sup>Ser) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Ala <sup>15</sup>Ala) 8-18 hAmilina 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp <sup>15</sup>Ala) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina 19-23 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Ala) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Glu) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Thr <sup>14</sup>Asp <sup>15</sup>Tyr) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Gln) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>13</sup>Asn <sup>14</sup>Glu <sup>15</sup>Tyr) 8-18 hAmilina 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Phe <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina (<sup>15</sup>Glu <sup>18</sup>Arg) 8-18 hAmilina 19-24 sCT, (<sup>19</sup>Phe <sup>22</sup>Phe) 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina (<sup>19</sup>Phe <sup>22</sup>His <sup>22</sup>Phe) 19-27 sCT, (<sup>13</sup>Ala <sup>14</sup>Asp) 8-18 hAmilina (<sup>19</sup>Phe <sup>22</sup>Phe) 19-27 sCT, (<sup>9</sup>Thr <sup>10</sup>His) 8-18 hAmilina 19-22 sCT, (<sup>9</sup>Thr <sup>10</sup>His <sup>14</sup>Gly <sup>15</sup>Leu <sup>17</sup>Ser <sup>18</sup>Arg) 8-19 hAmilina 20-23 sCT, 8-18 hAmilina (<sup>21</sup>Asn <sup>22</sup>Phe <sup>23</sup>Val) 19-23 sCT, 8-18 hAmilina (<sup>22</sup>Met) 19-27 sCT, 8-18 hAmilina (<sup>22</sup>Val) 19-27 sCT, (<sup>9</sup>Met <sup>12</sup>Thr <sup>13</sup>Tyr <sup>14</sup>Thr <sup>15</sup>Glu <sup>16</sup>Asp <sup>17</sup>Phe) 8-17 hAmilina (<sup>18</sup>Arg) 18-20 sCT. En otras formas de realización, los nuevos compuestos incluyen variaciones de los compuestos ejemplares anteriores con la hélice  $\alpha$  terminando en las posiciones correspondientes a 22, 23, 24, 25, 26 ó 27 de sCT. En otras palabras, el compuesto 8-18 hAmilina 19-24 sCT también se describe específicamente ya que este compuesto es simplemente 8-18 hAmilina 19-27-sCT descrito anteriormente truncado en la posición 24. Como otro ejemplo, el compuesto (13Ala 14Asp, 15Ala) 8-18 hAmilina 19-23 se describe específicamente a causa del lenguaje anterior aplicado a (13Ala 14Asp 15Ala) 8-18 hAmilina 19-22.

En ciertas formas de realización, la cola C-terminal de los péptidos LHC comprende los aminoácidos de la posición 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33 a la posición 36 ó 37 de hAmilina. En otras formas de realización, la cola C-terminal de los péptidos LHC comprende los aminoácidos de la posición 27 ó 28 a la posición 32 de sCT; sin embargo, cuando la región de bucle es de una calcitonina o análogo de calcitonina y la región de hélice  $\alpha$  es de una calcitonina o análogo de calcitonina, la última posición de la cola C-terminal no es Pro, Hyp, Hse o derivados de Hse. Alternativa o adicionalmente, la hélice  $\alpha$  descrita anteriormente de amilina y calcitonina puede comprender adicionalmente las sustituciones de una o más de (<sup>27</sup>Tyr) hAmilina, (<sup>29</sup>Arg) hAmilina, (<sup>32</sup>Val) hAmilina, (<sup>32</sup>Thr) hAmilina, (<sup>34</sup>Glu) hAmilina, (<sup>35</sup>Lys) hAmilina, (<sup>36</sup>Phe) hAmilina, (<sup>36</sup>Ala) hAmilina, (<sup>37</sup>Phe) hAmilina, (<sup>30</sup>Asn) sCT, (<sup>32</sup>Tyr) sCT, o cualquier combinación de las mismas.

En una forma de realización, una cola C-terminal de los péptidos LHC puede representarse por Xaa28 Xaa29 Xaa30 Xaa31 Xaa32 Xaa33 G Xaa35 Xaa36 Xaa37 Xaa38 (SEC ID N° 61), donde

40 Xaa28 es Lys, Tyr, o está ausente;

Xaa29 es Ser, Pro, o está ausente;

45 Xaa30 es Ser, Pro, Arg, o está ausente;

Xaa31 es Thr, o está ausente;

Xaa32 es Asn o está ausente;

50 Xaa33 es Val, Thr, o está ausente;

Xaa35 es Ser, Glu;

55 Xaa36 es Asn, Lys, o Gly;

Xaa37 es Thr, Phe, o Ala;

Xaa38 es Tyr, Phe, Pro, o está ausente;

60 con la condición de que cuando la región de bucle del agonista LHC es de una calcitonina o análogo de calcitonina y la región de hélice  $\alpha$  es de una calcitonina o análogo de calcitonina, la última posición de la cola C-terminal no es Pro, Hyp, Hse o derivados de Hse.

65 De nuevo, cada miembro del grupo de Markush, o una combinación de los mismos, es otra forma de realización de la invención y no se tiene que leer como una única unidad. Se contempla adicionalmente que la cola C-terminal puede contener no más de una, dos, o tres modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones de los compuestos descritos en este documento.

## ES 2 325 773 T3

Los ejemplos de la cola C-terminal de un agonista LHC incluyen, de manera no limitativa, 27-37 rAmilina, (<sup>27</sup>Tyr <sup>29</sup>Arg <sup>32</sup>Thr) 27-37 rAmilina, (<sup>29</sup>Arg <sup>32</sup>Thr) 28-37 rAmilina, 30-37 hAmilina, (<sup>32</sup>Thr) 30-37 hAmilina, (<sup>35</sup>Lys <sup>36</sup>Ala <sup>37</sup>Phe) 30-37 hAmilina, 30-36 hAmilina, (<sup>32</sup>Val) 30-36 hAmilina, (<sup>34</sup>Glu <sup>36</sup>Phe) 30-36 hAmilina, 31-37 hAmilina, 31-36 hAmilina, 33-36 hAmilina, 33-37 hAmilina, 28-32 sCT, (<sup>30</sup>Asn <sup>32</sup>Tyr) 28-32 sCT, y 27-32 sCT. En otras formas de realización, la cola C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos KSNFVPTN (SEC ID N° 62) o SNFVPTNV (SEC ID N° 63).

Se contempla adicionalmente que pueden introducirse no más de una, dos, o tres modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones a la cola C-terminal de la invención como se ha descrito en los párrafos precedentes. La cola C-terminal de los péptidos LHC puede comprender adicionalmente modificaciones o aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal. Dichas modificaciones incluyen la adición de compuestos tales como Lys, hasta 4 Lys, L-octilglicina, 4ABU (ácido 4-aminobutírico), 9Anc (ácido 9-amiononanoico), y/o grupos para la solubilidad, estabilidad, o suministro. Los ejemplos incluyen, de manera no limitativa, 33-37 hAmilina L-octilglicina, 33-37 hAmilina 4ABU, y 33-37 hAmilina 9Anc.

En un aspecto general, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden

- (a) cualquiera de las regiones de bucle del agonista LHC como se describe en este documento;
- (b) cualquiera de las regiones de hélice  $\alpha$  del agonista LHC como se describe en este documento; y
- (c) cualquiera de las colas C-terminales del agonista LHC como se describe en la presente memoria, con la condición de que cuando la región de bucle es de una calcitonina o análogo de calcitonina y la región de hélice  $\alpha$  es de una calcitonina o análogo de calcitonina, la última posición de la cola C-terminal no sea Pro, Hyp, Hse o derivados de Hse.

En otro aspecto general, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden

- (a) una región de bucle que comprende Xaa1 en la fórmula (II) o Xaa1 con modificaciones en el extremo N-terminal;
- (b) una región de hélice  $\alpha$  que comprende la región de hélice  $\alpha$  de tipo I o tipo II;
- (c) una cola C-terminal representada por la SEC ID N° 61, con la condición de que cuando la región de bucle es de una calcitonina o análogo de calcitonina y la región de hélice  $\alpha$  es de una calcitonina o análogo de calcitonina, la última posición de la cola C-terminal no sea Pro, Hyp, Hse o derivados de Hse. El extremo C-terminal puede comprender modificaciones adicionales.

Todavía en otro aspecto, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de fórmula (III):

Xaa1 X Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Y Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Xaa30 Xaa31 Xaa32 (SEC ID N° 64) en la que

Xaa1 es A, C, hC, D, E, F, I, L, K, hK, R, hR, S, Hse, T, G, Q, N, M, Y, W, P, Hyp, H, V o está ausente;

Xaa3 es A, D, E, N, Q, G, V, R, K, hK, hR, H, I, L, M, o está ausente;

Xaa4 es A, I, L, S, Hse, T, V, M, o está ausente;

Xaa5 es A, S, T, Hse, Y, V, I, L, o M;

Xaa6 es T, A, S, Hse, Y, V, I, L, o M;

Xaa8 es A, V, I, L, F, o M;

Xaa9 es L, T, S, Hse, V, I, o M;

Xaa10 es G, H, Q, K, R, N, hK, o hR;

Xaa11 es K, R, Q, N, M, hR, o H;

Xaa12 es L, I, V, F, M, W, o Y;

Xaa13 es A, F, Y, N, Q, S, Hse, o T;

## ES 2 325 773 T3

Xaa14 es A, D, E, G, N, K, Q, R, H, hR, o hK;

Xaa15 es A, D, E, F, L, S, Y, I, V, o M;

5 Xaa16 es L, F, M, V, Y, o I;

Xaa17 es H, Q, N, S, Hse, T, o V;

Xaa18 es K, hK, R, hR, H, u (Cit), o n (Orn);

10

Xaa19 es F, L, S, Hse, V, I, T, o está ausente;

Xaa20 es H, R, K, hR, hK, N, Q, o está ausente;

15

Xaa21 es T, S, Hse, V, I, L, Q, N, o está ausente;

Xaa22 es F, L, M, V, Y, o I;

Xaa23 es P o Hyp;

20

Xaa24 es P, Hyp, R, K, hR, hK, o H;

Xaa25 es T, S, Hse, V, I, L, F, o Y;

25

Xaa26 es N, Q, D, o E;

Xaa27 es T, V, S, F, I, o L;

Xaa28 es G o A;

30

Xaa29 es S, Hse, T, V, I, L, o Y;

Xaa30 es E, G, K, N, D, R, hR, hK, H, o Q;

35

Xaa31 es A, T, S, Hse, V, I, L, F, o Y; y

Xaa32 es F, P, Y, Hse, S, T, o Hyp;

40 en la que X e Y pueden crear un enlace y son restos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están unidos químicamente entre sí para formar un enlace intramolecular tal como enlaces disulfuro; enlace amida; alquilo, ácidos y alquilaminas que pueden formar lactamas cíclicas; alquilaldehydos o haluros de alquilo y alquilaminas que pueden condensarse y reducirse para formar una alquilamina o puente imina; o cadenas laterales que pueden conectarse para formar un enlace alquilo, alqueno, alquinilo, éter o tioéter. Las cadenas de alquilo pueden incluir grupos alquilo inferior que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. En ciertas formas de realización, el enlace intramolecular puede ser un enlace disulfuro, amida, imina, amina, alquilo y alqueno. En 45 ciertas formas de realización, X e Y se seleccionan independientemente entre Ser, Asp, Glu, Lys, Orn, o Cys. En ciertas formas de realización, X e Y son Cys y Cys. En otras formas de realización, X e Y son Ser y Ser. Todavía en otras formas de realización, X e Y son Asp y Lys o Lys y Asp.

50

En otro aspecto más, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de fórmula (IV):

55 Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 P Xaa24 T N Xaa27 G S Xaa30 Xaa31 Xaa32 (SEC ID N° 65) en la que

Xaa1 es A, C, D, F, I, K, S, T, o está ausente;

Xaa2 es C, D, S, o está ausente;

60

Xaa3 es A, D, N, o está ausente;

Xaa4 es A, L, T, o está ausente;

65

Xaa5 es A o S;

Xaa6 es T, A, S, o V;

## ES 2 325 773 T3

- Xaa7 es C, K, o A;  
Xaa8 es A, V, L, o M;  
5 Xaa9 es L o T;  
Xaa10 es G, H, o Q;  
Xaa11 es K, R, Q, o hArg;  
10 Xaa12 es L, W, o Y;  
Xaa13 es A, F, N, Q, S, o T;  
15 Xaa14 es A, D, E, G, N, K, Q, o R;  
Xaa15 es A, D, E, F, L, S, o Y;  
Xaa16 es L, o F;  
20 Xaa17 es H, Q, S, o V;  
Xaa18 es K, R, hArg, u (Cit), o n (Orn);  
25 Xaa19 es F, L, S, o está ausente;  
Xaa20 es H, Q, o está ausente;  
Xaa21 es T, N, o está ausente;  
30 Xaa22 es F, L, M, V, o Y;  
Xaa24 es P o R;  
35 Xaa27 es T o V;  
Xaa30 es E, G, K, o N;  
Xaa31 es A o T; y  
40 Xaa32 es F, P, o Y.

En otro aspecto más, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de fórmula (V):

Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 T Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 I Xaa13 Xaa14 Xaa15 L Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 P Xaa24 T N Xaa27 G S Xaa30 Xaa31 Xaa32, (SEC ID N° 66) en la que

- 50 Xaa1 es A, C, F, I, K, S, o está ausente;  
Xaa2 es C, D, o S;  
Xaa3 es A, D o N;  
55 Xaa4 es A, L o T;  
Xaa5 es A o S;  
60 Xaa7 es C o K;  
Xaa8 es A o V;  
Xaa9 es L o T;  
65 Xaa10 es G, H, o Q;  
Xaa11 es K, R, o hArg;

## ES 2 325 773 T3

Xaa13 es A, F, N, S, o T;

Xaa14 es A, D, E, G, N, Q, o R;

5 Xaa15 es A, E, F, L, S, o Y;

Xaa17 es H, S, o V;

Xaa18 es K, R, hArg, u (Cit), o n (Orn);

10 Xaa19 es F, L, o S;

Xaa20 es H o Q;

15 Xaa21 es T o N;

Xaa22 es F, L, M, V, o Y;

Xaa24 es P o R;

20 Xaa27 es T, o V;

Xaa30 es E, G, K, o N;

25 Xaa31 es A, o T; y

Xaa32 es F, P, o Y.

30 En un aspecto general, la secuencia de fórmula (III), (IV), o (V) comprende adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más modificaciones de sustituciones, inserciones, deleciones, elongaciones y/o derivatizaciones. En ciertas formas de realización, la secuencia de fórmula (III), (IV), o (V) comprende una Val insertada entre los aminoácidos de las posiciones 22 y 23. En otras formas de realización, la secuencia de fórmula (III), (IV), o (V) comprende una Gln insertada entre las posiciones 22 y 23. Todavía en otras formas de realización, la secuencia de fórmula (III), (IV), o (V) comprende una secuencia de Gln-Thr-Tyr entre las posiciones 22 y 23. Todavía en otras formas de realización, la secuencia de fórmula (III), (IV), o (V) comprende una secuencia de Leu-Gln-Thr-Tyr (SEC ID N° 67) entre las posiciones 22 y 23. En otro aspecto general, las modificaciones de la fórmula (III), (IV), o (V) pueden ser en el extremo N-terminal. En ciertas formas de realización, la parte N-terminal de la fórmula (III), (IV), o (V) tiene una octilglicina añadida. En otras formas de realización, la parte N-terminal de la fórmula (III), (IV), o (V) tiene un isocap añadido.

40 En otro aspecto más, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos de fórmula (VI):

45 Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 P Xaa24 T N Xaa27 G S Xaa30 Xaa31 Xaa32 (SEC ID N° 68) en la que

Xaa1 es A, C, D, F, K, T, o está ausente;

50 Xaa2 es A, C, D, S, o está ausente;

Xaa3 es A, D, N, o está ausente;

Xaa4 es A, L, T, o está ausente;

55 Xaa5 es A o S;

Xaa6 es A, S, T, o V;

60 Xaa7 es A, C, o K;

Xaa8 es A, L, M, o V;

Xaa9 es L o T;

65 Xaa10 es G, H, o Q;

Xaa11 es K, Q, o R;

## ES 2 325 773 T3

Xaa12 es L, W, o Y;

Xaa13 es A, N, Q, S, o T;

5 Xaa14 es A, D, E, G, K, N, Q, o R;

Xaa15 es A, D, E, F, L, S, o Y;

Xaa16 es F o L;

10

Xaa17 es H, Q, S o V;

Xaa18 es K, o R;

15

Xaa19 es F, L, S, o está ausente;

Xaa20 es H, K, Q, o está ausente;

Xaa21 es Q, T, o está ausente;

20

Xaa22 es F, L, o Y;

Xaa24 es P o R;

25

Xaa27 es T o V;

Xaa30 es E, K o N;

Xaa31 es A o T; y

30

Xaa32 es F, Y, o está ausente.

35 En un aspecto general, la secuencia de fórmula (VI) comprende adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más modificaciones de sustituciones, inserciones, deleciones, elongaciones y/o derivatizaciones. En ciertas formas de realización, la secuencia de fórmula (III), (IV), (V) o (VI) comprende una deleción en la posición 24.

40 En otro aspecto más, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende

a) una región de bucle que comprende Xaa1 de la fórmula (II); donde Xaa1 comprende una secuencia de aminoácidos de X Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Y (SEC ID N° 69) en la que,

45 Xaa2 es cualquier aminoácido o está ausente;

45

Xaa3 es Ala, Gly, Ser, Asp o está ausente;

Xaa4 es Asn, Ala, Asp, Gly o está ausente;

50

Xaa5 es Ala, Leu, Thr, o Ser;

Xaa6 es Ala, Ser, o Thr; y

55

Xaa7 es Ala, Ser, Val, Hse, ácido (S)-2-amino-3-hidroxi-metilbutanoico (Ahb), ácido (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-metil-pentanoico (Ahp), d-Thr, Thr, o un derivado de los mismos;

60 X e Y son aminoácidos capaces de crear un enlace y son restos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que pueden unirse químicamente entre sí para formar un enlace intramolecular tal como un enlace disulfuro; un enlace amida; una lactama cíclica formada por un ácido de alquilo y una alquilamina; una alquilamina o puente imina formado condensado y reduciendo alquilaldehídos o haluros de alquilo y alquilaminas; y un enlace alquilo, alqueno, alquino, éter o tioéter formado por la conexión de cadenas laterales;

65 b) una región de hélice  $\alpha$  de tipo I que comprende la secuencia XI V L Xaa10 Xaa11 L S Q Xaa15 L Xaa17 Xaa18 L Q T Xaa22 P Xaa24 T N T X1 (SEC ID N° 70), en la que

Xaa10 es Gly o Aib;

## ES 2 325 773 T3

Xaa1 es Lys, Arg, Orn, hArg, Cit, hLys, o Lys(for);

Xaa15 es Glu o Phe;

5 Xaa17 es His o Aib;

Xaa18 es Lys, Arg, Orn, hArg, Cit, hLys, Lys(for), Lys(PEG 5000);

Xaa22 es Tyr o Leu;

10 Xaa24 es Arg o Pro; y

X1 está ausente o comprende 1-4 aminoácidos adicionales; y

15 c) una cola C-terminal que comprende la secuencia Xaa28 Xaa29 Xaa30 Xaa31 Xaa32 Xaa33 G Xaa35 Xaa36 Xaa37 Xaa38 (SEC ID N° 71), en la que

Xaa28 es Lys, Tyr, o está ausente;

20 Xaa29 es Ser, Pro, o está ausente;

Xaa30 es Ser, Pro, Arg, o está ausente;

25 Xaa31 es Thr, o está ausente;

Xaa32 es Asn o está ausente;

Xaa33 es Val, Thr, o está ausente;

30 Xaa35 es Ser, Glu;

Xaa36 es Asn, Lys, o Gly;

35 Xaa37 es Thr, Phe, o Ala;

Xaa38 es Tyr, Phe, Pro, o está ausente;

40 con la condición de que cuando la región de bucle es de una calcitonina o análogo de calcitonina y la región de hélice  $\alpha$  de una calcitonina o análogo de calcitonina, la última posición de la cola C-terminal no sea Pro, Hyp, Hse o derivados de Hse.

45 En otro aspecto más, los péptidos LHC para su utilización en la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende

a) una región de bucle que comprende Xaa1;

50 a) una región de bucle que comprende Xaa1 de la fórmula (II); en la que Xaa1 comprende una secuencia de aminoácidos de X Xaa2 Xaa3 Xaa4 Xaa5 Xaa6 Xaa7 Y (SEC ID N° 72) en la que,

Xaa2 es cualquier aminoácido o está ausente;

55 Xaa3 es Ala, Gly, Ser, Asp o está ausente;

Xaa4 es Asn, Ala, Asp, Gly o está ausente;

Xaa5 es Ala, Leu, Thr, o Ser,

60 Xaa6 es Ala, Ser, o Thr, y

Xaa7 es Ala, Ser, Val, Hse, Ahb, Ahp, d-Thr, Thr, o un derivado de los mismos;

65 X e Y son aminoácidos capaces de crear un enlace y son restos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que pueden unirse químicamente entre sí para formar un enlace intramolecular tal como un enlace disulfuro; un enlace amida; una lactama cíclica formada por un ácido de alquilo y una alquilamina; una alquilamina

## ES 2 325 773 T3

o puente imina formado condensando y reduciendo alquilaldehídos o haluros de alquilo y alquilaminas; y un enlace alquilo, alqueno, alquino, éter o tioéter formado por la conexión de cadenas laterales;

5 b) una región de hélice  $\alpha$  de tipo II que comprende la secuencia X1 Xaa8 Xaa9 Xaa10 R Xaa12 Xaa13 Xaa14 Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa16 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 P Xaa24 T N T X1 (SEC ID N° 73) en la que

Xaa8 es Ala o Val;

10 Xaa9 es Thr, Met o Leu;

Xaa10 es Gln, Gly, His;

Xaa12 es Leu, o Thr;

15

Xaa13 es Ala, Thr, Asn, Phe, Tyr, Ser, o Thr;

Xaa14 es Asn, Arg, Ala, Asp, Glu, Gln, Thr, o Gly;

20

Xaa15 es Phe, Leu, Ser, Glu, Ala, Asp, o Tyr,

Xaa16 es Leu o Asp;

Xaa17 es Val, His, Ser, Phe, o Aib;

25

Xaa18 es His, Arg, Lys, Orn, hArg, Cit, hLys, Lys(for), o Lys(PEG5000);

Xaa19 es Leu, Ser o Phe;

30

Xaa20 es Gln o His;

Xaa21 es Thr o Asn;

Xaa22 es Tyr, Val, Phe, Leu o Met;

35

Xaa24 es Arg o Pro; y

X1 está ausente o comprende 1-4 aminoácidos adicionales; y

40

c) una cola C-terminal que comprende la secuencia Xaa28 Xaa29 Xaa30 Xaa31 Xaa32 Xaa33 G Xaa35 Xaa36 Xaa37 Xaa38 (SEC ID N° 74), en la que

Xaa28 es Lys, Tyr, o está ausente;

45

Xaa29 es Ser, Pro, o está ausente;

Xaa30 es Ser, Pro, Arg, o está ausente;

50

Xaa31 es Thr, o está ausente;

Xaa32 es Asn, o está ausente;

Xaa33 es Val, Thr, o está ausente;

55

Xaa35 es Ser, o Glu;

Xaa36 es Asn, Lys, o Gly;

60

Xaa37 es Thr, Phe, o Ala;

Xaa38 es Tyr, Phe, Pro, o está ausente.

65

## ES 2 325 773 T3

Todavía en otro aspecto, los péptidos LHC para su utilización en la invención incluyen:

5 (SEC ID Nº 75) KCNTATCVLGKLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 76) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTLPRNTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 77) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPPTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 78) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNVGSNTY  
10 (SEC ID Nº 79) KCNTATCVLGRLSQELHLQTLPTNVGSNTY  
(SEC ID Nº 80) KCNTATCVLGRLANFLHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 81) ACNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 82) KCNAATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNGSNTY  
(SEC ID Nº 83) KCNTAACVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
15 (SEC ID Nº 84) CANLSTCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 85) Isocaproil-STAVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 86) CSNASTCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 87) CSNLATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
20 (SEC ID Nº 88) CSNLSACVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 89) KCNTATCVLGRLSQELHKLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 90) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSGTP  
(SEC ID Nº 91) CSALSTCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
25 (SEC ID Nº 92) Ac-(Agy)SNLST(Agy)VLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 92) Ac-K(Agy)NTAT(Agy)VLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 93) Isocaproil-STAVL(Aib)RLSQELRLQTYPRTNTGSGTP  
(SEC ID Nº 94) Isocaproil-STAVLG[K(For)]LSQELH[K(For)]LQTYPRTNTGSGTP  
30 (SEC ID Nº 95) Isocaproil-STAVL(Aib)[K(For)]LSQEL(Aib)[K(For)]LQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 96) Isocaproil-STAVL(Aib)[K(For)]LSQEL(Aib)[K(For)]LQTYPRTNVGSNTY  
(SEC ID Nº 97) KCNTATCLLQQLQKLLQKLKQYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 98) KCNTASCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
35 (SEC ID Nº 99) KCNTAVCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 100) KCNTATCVLGRLSQELHRYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 101) KCNTATCVLGK(For)LSQELHK(For)LQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 102) KCNTA(d-Thr)CVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
40 (SEC ID Nº 103) KCNTA(dAh)CVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 104) Ac-ACNTATCVLGRLSQELHK(PEG5000)LQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 105) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 106) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTLQTYPRTNTGSNTY  
45 (SEC ID Nº 107) KCNTATCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 108) KCNTSTCVLGRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY  
(SEC ID Nº 109) KCNTATCATQRLSQELHRLQTYPRTNTGSNTY

50

55

60

65

ES 2 325 773 T3

(SEC ID N° 110) KCNTATCATQRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 111) KCNTSTCATQRLANELVRLQTYPRNTVGSNTY  
 5 (SEC ID N° 112) KCNTA(Hse)CVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 113) KCNTA(Ahb)CVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 114) KCNTA(Ahp)CVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 115) KCNTAT(OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)CVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 10 (SEC ID N° 116) KCNTATCVLG(Om)LSQELH(Orn)LQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 117) KCNTATCVLG(Cit)LSQELH(Cit)LQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 118) KCNTATCVLG(homoK)LSQELH(homoK)LQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 119) L-OctilglicinaKCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 15 (SEC ID N° 120) N-3,6-dioxaoctanoil-CNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 121) KCNTATCMLGRYTQDFHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 122) DSNLSTKVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 123) KDNTATKVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 20 (SEC ID N° 124) CNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 125) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY(9Anc)  
 (SEC ID N° 126) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY(L-octilglicina)  
 (SEC ID N° 127) N-isocaproil-KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 25 (SEC ID N° 128) KCNTATCVLG(homoR)LSQELH(homoR)LQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 129) FCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 130) KCNTATCVLGRLSQELH(Cit)LQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 131) KCNTATCVLGRLSQELH(Om)LQTYPRNTVGSNTY  
 30 (SEC ID N° 132) ICNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 133) 1-Octilglicina-CNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 134) Isocaproil-CNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 135) KCNTATCVLG(Cit)LSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 35 (SEC ID N° 136) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY(4ABU)  
 (SEC ID N° 137) Isocaproil-KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY(4ABU)  
 (SEC ID N° 138) KCNTSTCATQRLANELVRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 139) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 40 (SEC ID N° 140) KCNTATCVLGRSLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 141) KCNTATCVLHRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 142) KCNTATCVLGRADFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 143) CNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 45 (SEC ID N° 144) KCNTATCVLGRLSQELHRLQNFVPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 145) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 146) ACNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 147) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 50 (SEC ID N° 148) KCNTATCVLHRLAGLLSRSQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 149) KCNTATCVLGRADALHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 150) KCNTATCVLGRLAFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 151) SCNTATCVLGRADFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 55 (SEC ID N° 152) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 153) KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 154) KCNTATCVLGRLEFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 155) SCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTVGSNTY  
 60 (SEC ID N° 156) KCNTATCVLGRLEFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 157) KCNTATCVLGRLEFLHRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 158) KCNTATCVLGRLEFLHRLQTYPRNTVGSNTY

65

## ES 2 325 773 T3

(SEC ID N° 159) KCNTATCVLGRRLAQFLHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 160) KCNTATCVLGRRLADFLHRFQTFPRTNTGSNTY  
 5 (SEC ID N° 161) KCNTATCVLGRRLADFLHRFHFTFPRTNTGSNTY  
 (SEC ID N° 162) KCNTATCVLGRRLADFLHRFQTFPRTNTGSGTP  
 (SEC ID N° 163) CNTATCVLGRRLADFLHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 164) KCDTATCVLGRRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY  
 10 (SEC ID N° 165) KCNTATCVLGRRLFDLHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 166) KCNTATCVLGRRLAAALHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 167) TCDTATCVLGRRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 168) CSNLSTCATQRLANELVRLQTYPRNTVGSNTY  
 15 (SEC ID N° 169) KCNTATCATQRLANELVRLQTYPRNTVGSNTY  
 (SEC ID N° 170) CSNLSTCVLGRRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY  
 (SEC ID N° 171) KCNTATCVLGRRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY

20 En otro aspecto, los péptidos LHC para su utilización en la invención incluyen fragmentos biológicamente activos de las SEC ID N° 75 a 171. Los fragmentos biológicamente activos pueden comprender deleciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos. En ciertas formas de realización, las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N° 75 a 171 comprenden por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones. En otras formas de realización, las secuencias de aminoácidos de las SEC  
 25 ID N° 75 a 171 tienen no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 modificaciones tales como sustituciones, inserciones, deleciones, y/o derivatizaciones. En otro aspecto más de la invención, los compuestos de la invención incluyen los que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos el 75, 80, 85, 90, 95, o 97% con cualquiera de las SEC ID N° 75 a 171. El porcentaje de identidad se determina por análisis con el módulo AlignX® en Vector  
 30 NTI® (Invitrogen; Carlsbad CA). Se pretende que cada porcentaje de identidad descrito, o referencia a fragmentos biológicamente activos o modificaciones se apliquen a cada SEC ID N° individualmente. Por ejemplo, cada forma de realización, fragmento, modificación, o % de identidad descrito es aplicable a las SEC ID N° 75, 76, 77, 78, 44, etc., o a cualquier grupo de SEC ID N°.

35 En general, los agonistas de amilina o análogos agonistas de amilina se reconocen porque hacen referencia a compuestos que, interaccionando directa o indirectamente o uniéndose con uno o más receptores, imitan una acción de la amilina. Por consiguiente, los compuestos de la invención pueden actuar como un agonista para por lo menos un efecto biológico de calcitonina, amilina, CGRP, o cualquier combinación de los tres descritos en la presente memoria o unirse a por lo menos uno de los receptores de amilina, calcitonina, o CGRP. A la inversa, los antagonistas de amilina, interaccionado directa o indirectamente o uniéndose con uno o más receptores, suprimen una acción de la amilina.  
 40 Dichas interacciones o acontecimientos de unión incluyen los que afectan a los niveles de grelina.

Los antagonistas de amilina incluyen AC66 (sCT[8-32]) (SEC ID N° 172) y derivados tales como AC187 (Ac 30Asn, 32Tyr-sCT[8-32]) (SEC ID N° 173) un fragmento peptídico de 25 aminoácidos de calcitonina de salmón, desarrollado como un antagonista del receptor selectivo de amilina sobre receptores de CGRP. Otros antagonistas  
 45 incluyen antagonistas descritos en las patentes US n° 5.625.032 y 5.580.953. Dichos compuestos antagonistas incluyen los que comprenden la fórmula (VII): X-R1-Thr-Gln-R2-Leu-Ala-Asn-R3-Leu-Val-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Val-Gly-R4-Asn-Thr-Tyr-NH<sub>2</sub> (SEC ID N° 174) en la que

R1 es Ala o un enlace;

50 R2 es Arg, Gln, Lys, Asn o Leu;

R3 es Gln, Glu, Asn, Asp o Phe; R4 es Ala o Ser, y

55 X es hidrógeno o un grupo acetilo.

Los antagonistas de amilina pueden estar acetilados o no acetilados en el extremo N-terminal e incluyen formas ácidas así como de amida de la molécula. Los ejemplos de antagonistas de amilina incluyen, de manera no limitativa,  
 60 acetil-Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Glu Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 15), Ala Thr Gln Gln Leu Ala Asn Gln Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 176), Ala Thr Gln Leu Leu Ala Asn Gln Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 177), Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Gln Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 178), Ala Thr Gln Leu Leu Ala Asn Glu Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg  
 65 Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 179), Ala Thr Gln Gln Leu Ala Asn Glu Leu Val Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr (SEC ID N° 180).

## ES 2 325 773 T3

Los métodos para ensayar compuestos para la actividad amilina son conocidos en la técnica. Se describen métodos y ensayos de exploración ejemplares para ensayar agonistas o antagonistas de amilina en los Ejemplos, particularmente el Ejemplo 4 de la presente memoria, y en las patentes US nº 5.264.372 y 5.686.411.

5 La actividad como agonistas y/o análogos de amilina puede confirmarse y cuantificarse realizando diversos ensayos de exploración, incluyendo el ensayo de unión al receptor en el núcleo accumbens, seguido del ensayo del músculo sóleo, un ensayo de vaciado gástrico, o por la capacidad de inducir hipocalcemia o reducir la hiperglucemia pospandrial en mamíferos.

10 El ensayo de unión a receptor, un ensayo de competición que mide la capacidad de los compuestos de unirse específicamente a receptores de amilina unidos a membrana, se describe en las patentes US nº 5.264.372 y 5.686.411. Una fuente preferida de las preparaciones de membrana usadas en el ensayo es el prosencéfalo basal que comprende membranas del núcleo accumbens y regiones adyacentes. Los compuestos que se están ensayando compiten por la unión a estas preparaciones de receptor con amilina de rata 125I Bolton Hunter. Las curvas de competición, donde se representa la cantidad unida (B) como una función del log de la concentración de ligando, se analizan por ordenador usando análisis por regresión no lineal a una ecuación logística de 4 parámetros (programa INPLOT; GraphPad Software, San Diego, Calif.) o el programa ALLFIT de DeLean *et al.* (ALLFIT, Versión 2.7 (NIH, Bethesda, Md. 20892)). Munson y Rodbard (1980) Anal. Biochem. 107:220-239.

20 Los ensayos de actividad biológica de los agonistas/análogos de amilina en el músculo sóleo pueden realizarse usando métodos descritos previamente (Leighton *et al.* (1988) Nature 335:632-635; Cooper *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7763-7766), en los que puede evaluarse la actividad de un agonista de amilina midiendo la inhibición de la síntesis de glucógeno estimulada por insulina. En resumen, un método ejemplificativo incluye tiras del músculo sóleo preparadas a partir de ratas Wistar macho en ayunas durante 12 h. Los tendones de los músculos se ligan antes de la fijación a las pinzas de acero inoxidable. Las tiras de músculo se preincuban en matraces Erlenmeyer que contienen 3,5 ml de tampón bicarbonato de Krebs-Ringer, ácido N-2-hidroxietyl-peperazina-N'-2-etano-sulfónico 7 mM, pH 7,4, y piruvato 5,5 mM. Los matraces se precintan y se gasean continuamente con O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la proporción 19:1 (v/v). Después de la preincubación de los músculos en este medio durante 30 min. a 37°C en un baño de agua oscilante, las tiras de músculo se transfieren a viales similares que contienen medio idéntico (excepto el piruvato) con [U-14C] glucosa añadida (0,5 µCi/ml) e insulina (100 µU/ml). Los matraces se precintan y se vuelven a gasear durante 15 min. iniciales en una incubación de 1 h. Al final del periodo de incubación, los músculos se transfieren y se congelan rápidamente en N<sub>2</sub> líquido. La concentración de lactato en el medio de incubación puede determinarse espectrofotométricamente y medirse la incorporación de [U-14C] glucosa en el glucógeno. La actividad antagonista de amilina se evalúa midiendo la reanudación de la síntesis de glucógeno estimulada por insulina en presencia de amilina de rata 100 nM y un antagonista de amilina.

Se dan a conocer métodos para medir la velocidad de vaciado gástrico en, por ejemplo, Young *et al.* En un método de rojo fenol, ratas conscientes reciben por sonda un gel incoloro que contiene metilcelulosa y un indicador de rojo fenol. Veinte minutos después de la sonda, los animales se anestesian usando halotano, se expone el estómago y se sujeta en los esfínteres pilórico y esofágico inferior, se retira y se abre en una solución alcalina. El contenido del estómago puede derivarse de la intensidad del rojo fenol en la solución alcalina, medida por la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En un método de glucosa tritiada, se sondan ratas conscientes con glucosa tritiada en agua. Las ratas se controlan suavemente por la cola, cuya punta se anestesia usando lidocaína. Se recoge el tritio del plasma separado de la sangre de la cola en diversos momentos puntuales y se detecta en un contador beta. Los compuestos de ensayo se administran normalmente aproximadamente un minuto antes de la sonda.

Los compuestos agonistas y antagonistas de amilina pueden mostrar actividad en el ensayo de unión a receptor del orden de menos de aproximadamente 1 a 5 nM, preferentemente menos de aproximadamente 1 nM y más preferentemente menos de aproximadamente 50 pM. En el ensayo del músculo sóleo, los compuestos agonistas de amilina pueden mostrar valores de EC<sub>50</sub> del orden de menos de aproximadamente 1 a 10 micromolar. En el ensayo del músculo sóleo, los antagonistas de amilina pueden mostrar valores de IC<sub>50</sub> del orden de menos de aproximadamente 1 a 2 micromolar. En los ensayos de vaciado gástrico, los compuestos agonistas preferidos muestran valores de ED<sub>50</sub> del orden de menos de 100 µg/rata. Los compuestos antagonistas no mostrarían efecto o mostrarían el efecto opuesto en el ensayo de vaciado gástrico.

55 En un método ejemplificativo para la preparación de los compuestos, los compuestos de la invención puede prepararse usando técnicas convencionales de síntesis peptídica en fase sólida y preferentemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Típicamente, usando dichas técnicas, se acopla un aminoácido protegido con α-N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica creciente en una resina a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidinona o cloruro de metileno en presencia de agentes de acoplamiento tales como diciclohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol en presencia de una base tal como diisopropiletilamina. El grupo protector α-N-carbamoilo se retira del péptido en la resina resultante usando un reactivo tal como ácido trifluoroacético o piperidina, y la reacción de acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido N-prottegido deseado que se debe añadir a la cadena peptídica. Dichos grupos N-protectores son bien conocidos en la técnica, siendo preferidos en la presente memoria t-butiloxicarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Otros métodos para sintetizar o expresar amilina y agonistas de amilina y purificarlos resultan conocidos por los expertos en la materia.

*Dosificación/Formulación*

Los agentes antiobesidad y los agentes inductores del peso (a los que se hace referencia en la presente memoria en esta sección como los “compuestos”) pueden administrarse solos o en combinación con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis sencillas o múltiples. Estos compuestos farmacéuticos pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipientes conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington’s Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Véase también Wang *et al.* (1988) J. of Parenteral Sci. and Tech., Technical Report N° 10, Sup. 42:2S.

En general, los compuestos pueden formularse en una composición farmacéutica estable, segura para su administración a un paciente. Las formulaciones farmacéuticas contempladas para su utilización en la invención pueden comprender de aproximadamente el 0,01 al 1,0% (p/v), en ciertos casos del 0,05 al 1,0%, del compuesto, de aproximadamente el 0,02 al 0,5% (p/v) de un tampón acetato, fosfato, citrato o glutamato que permite un pH de la composición final de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0; de aproximadamente el 1,0 al 10% (p/v) de un tonificador de carbohidrato o alcohol polihídrico y, opcionalmente, de aproximadamente el 0,005 al 1,0% (p/v) de un conservante seleccionado de entre el grupo compuesto por m-cresol, alcohol bencílico, metil, etil, propil y butilparabenos y fenol. Dicho conservante generalmente se incluye si el péptido formulado tiene que incluirse en un producto de uso múltiple.

En una forma de realización particular de la presente invención, una formulación farmacéutica de la presente invención puede contener un intervalo de concentraciones del compuesto, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 98% p/p, o entre aproximadamente el 1 y aproximadamente el 98% p/p, o preferentemente entre el 80% y el 90% p/p, o preferentemente entre aproximadamente el 0,01% y aproximadamente el 50% p/p, o más preferentemente entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 25% p/p en esta realización. Puede usarse una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración deseada de solución.

También pueden estar presentes agentes tonificantes adicionales tales como cloruro sódico, así como otros excipientes conocidos, si se desea. En algunos casos, dichos excipientes son útiles para el mantenimiento de la tonicidad global del compuesto. Puede incluirse un excipiente en las formulaciones actualmente descritas a diversas concentraciones. Por ejemplo, puede incluirse un excipiente en el intervalo de concentración de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 20% p/p, preferentemente entre aproximadamente el 0,02% y el 0,5% p/p, de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 10% p/p, o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% p/p. Además, de forma similar a las presentes formulaciones en sí mismas, puede incluirse un excipiente en forma sólida (incluyendo en polvo), líquida, semisólida o de gel.

Las formulaciones farmacéuticas pueden componerse en diversas formas, por ejemplo, sólida, líquida, semisólida o líquida. se hace referencia a que el término “sólido”, como se utiliza en la presente memoria, comprende todas las utilizaciones normales de este término incluyendo, por ejemplo, formulaciones en polvo y liofilizadas. Las formulaciones actualmente descritas pueden estar liofilizadas.

Las expresiones tampón, solución tamponante y solución tamponada, cuando se usan haciendo referencia a la concentración de iones hidrógeno o pH, se refieren a la capacidad de un sistema, particularmente una solución acuosa, de resistir un cambio de pH al añadir un ácido o base, o al diluir con un disolvente. Es característico de las soluciones tamponadas que experimentan pequeños cambios de pH al añadir un ácido o base, la presencia de un ácido débil y una sal del ácido débil, o una base débil y una sal de la base débil. Un ejemplo del sistema anterior es el ácido acético y el acetato sódico. El cambio de pH se ligero siempre que la cantidad de iones hidronio o hidroxilo añadida no exceda la capacidad del sistema tamponante de neutralizarla.

Como se describe en la presente memoria, es adecuada una diversidad de vehículos líquidos para su utilización en las formulaciones de agentes peptídicos antiobesidad, por ejemplo, agua o una mezcla o suspensión de agua/disolvente orgánico.

La estabilidad de una formulación peptídica para su utilización en la presente invención se potencia manteniendo el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0 cuando está en forma líquida. En ciertas formas de realización, el pH de la formulación se mantiene en el intervalo de aproximadamente 3,5 a 5,0, o de aproximadamente 3,5 a 6,5, en algunas formas de realización de aproximadamente 3,7 a 4,3, o de aproximadamente 3,8 a 4,2. En algunas formas de realización, el pH puede ser de aproximadamente 4,0. Aunque no se pretende limitarse por esta teoría, actualmente se hace referencia a que cuando el pH de la formulación farmacéutica excede de 5,5, puede acelerarse la degradación química del péptido de modo que la vida útil sea de menos de aproximadamente dos años.

En ciertas formas de realización, el tampón con los agentes antiobesidad es un tampón acetato (preferiblemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 60 mM), tampón fosfato (preferiblemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 30 mM) o tampón glutamato (preferiblemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 1-5 a aproximadamente 60 mM). En algunas formas de realización, el tampón es acetato (preferiblemente a una concentración de formulación final de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mM).

Puede incluirse un estabilizador en las formulaciones de agentes antiobesidad pero, y de forma importante, no es obligatoriamente necesario. Si se incluye, sin embargo, un estabilizador útil en la práctica de la presente invención

## ES 2 325 773 T3

es un carbohidrato o un alcohol polihídrico. Un estabilizador adecuado útil en la práctica de la presente invención es de aproximadamente el 1,0 al 10% (p/v) de un carbohidrato o alcohol polihídrico. Los alcoholes polihídricos y carbohidratos comparten la misma característica en sus estructuras, es decir, -CHOH-CHOH-, que es responsable de estabilizar las proteínas. Los alcoholes polihídricos incluyen compuestos tales como sorbitol, manitol, glicerol, y polietilenglicoles (PEG). Estos compuestos son moléculas de cadena lineal. Los carbohidratos, tales como manosa, ribosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, maltosa, inositol, y lactosa, por otro lado, son moléculas cíclicas que pueden contener un grupo ceto o aldehído. Estas dos clases de compuestos han demostrado ser eficaces para estabilizar las proteínas frente a la desnaturalización causada por temperaturas elevadas y por procesos de congelación-descongelación o secado por congelación. Los carbohidratos adecuados incluyen: galactosa, arabinosa, lactosa o cualquier otro carbohidrato que no tenga un efecto adverso sobre un paciente diabético, es decir, el carbohidrato no se metabolice para formar concentraciones inaceptablemente grandes de glucosa en la sangre. Dichos carbohidratos son bien conocidos en la técnica como adecuados para diabéticos. La sacarosa y la fructosa son adecuadas para su utilización con el compuesto en aplicaciones no diabéticas (por ejemplo, el tratamiento de la obesidad).

En ciertas formas de realización, si se incluye un estabilizador, el compuesto se estabiliza con un alcohol polihídrico tal como sorbitol, manitol, inositol, glicerol, xilitol, y copolímero de polipropileno/etilenglicol, así como diversos polietilenglicoles (PEG) de peso molecular 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, y 8000. El manitol es el alcohol polihídrico preferido en algunas formas de realización. Otra característica útil de las formulaciones liofilizadas de la presente invención es el mantenimiento de la tonicidad de las formulaciones liofilizadas descritas en la presente memoria con el mismo componente de formulación que sirve para mantener su estabilidad. En algunas formas de realización, el manitol es el alcohol polihídrico preferido usado para este propósito.

La United States Pharmacopeia (USP) establece que deben añadirse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones convenidas en recipientes de múltiples dosis. Deben estar presentes en concentración adecuada en el momento de su uso para evitar la multiplicación de microorganismos introducidos inadvertidamente en la preparación al retirar parte de los contenidos con una aguja hipodérmica y una jeringa, o al usar otros medios invasivos para el suministro, tales como inyectores de pluma. Los agentes anti-microbianos deben evaluarse para asegurar la compatibilidad con todos los demás componentes de la fórmula, y su actividad debe evaluarse en la fórmula total para asegurar que un agente particular que es eficaz en una formulación no es ineficaz otra. No es raro encontrar que un agente antimicrobiano particular será eficaz en una formulación pero no en otra formulación.

Un conservante es, en el sentido farmacéutico habitual, una sustancia que evita o inhibe el crecimiento microbiano y puede añadirse a formulaciones farmacéuticas para este propósito para evitar el deterioro consecuente de la formulación por los microorganismos. Aunque la cantidad del conservante no es grande, no obstante puede afectar a la estabilidad global del péptido.

Aunque el conservante para su utilización en las composiciones farmacéuticas puede estar comprendido entre 0,005 y 1,0% (p/v), en algunas formas de realización el intervalo para cada conservante, solo o en combinación con otros, es: alcohol bencílico (0,1-1,0%), o m-cresol (0,1-0,6%), o fenol (0,1-0,8%) o una combinación de metil (0,05-0,25%) y etil o propil o butil (0,005%-0,03%) parabenos. Los parabenos son ésteres de alquilo inferior del ácido parahidroxibenzoico. Se expone una descripción detallada de cada conservante en Remington's Pharmaceutical Sciences por Martin.

La pramlintida, <sup>25,28,29</sup>Pro-amilina humana, no tiene tendencia a adsorberse en el vidrio de un recipiente de vidrio cuando está en forma líquida, por lo tanto, no se requiere un tensioactivo para estabilizar adicionalmente la formulación farmacéutica. Sin embargo, con respecto a compuestos que tienen dicha tendencia cuando están en forma líquida, debe usarse un tensioactivo en su formulación. Estas formulaciones después pueden liofilizarse. Los tensioactivos frecuentemente causan la desnaturalización de las proteínas, tanto por alteración hidrófoba como por separación de los puentes salinos. Concentraciones relativamente bajas de tensioactivo pueden ejercer una potente actividad desnaturizante, a causa de las fuertes interacciones entre los restos tensioactivos y los sitios reactivos de las proteínas. Sin embargo, el uso prudente de esta interacción puede estabilizar las proteínas frente a la desnaturalización entre superficies o superficial. Los tensioactivos que podrían estabilizar adicionalmente el péptido pueden estar opcionalmente comprendidos en el intervalo de aproximadamente el 0,001 al 0,3% (p/v) de la formulación total e incluyen polisorbato 80 (es decir, monooleato de polioxietileno(20) sorbitán), CHAPS<sup>®</sup> (es decir, 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]), Brij<sup>®</sup> (por ejemplo, Brij 35, que es (lauril éter de polioxietileno(23)), poloxámero, u otro tensioactivo no iónico.

También puede ser deseable añadir cloruro sódico u otra sal para ajustar la tonicidad de la formulación farmacéutica, dependiendo del tonificador seleccionado. Sin embargo, esto es opcional y depende de la formulación particular seleccionada. Las formulaciones parenterales preferentemente pueden ser isotónicas o sustancialmente isotónicas.

Un vehículo preferido para productos parenterales es el agua. El agua de calidad adecuada para administración parenteral puede prepararse por destilación o por ósmosis inversa. El agua para inyección es el vehículo acuoso preferido para su utilización en las formulaciones farmacéuticas.

Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en las formulaciones farmacéuticas. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, agentes humectantes, emulsionantes, aceites, antioxidantes, agentes de expansión

## ES 2 325 773 T3

5 sión, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterion (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Además, las soluciones poliméricas, o mezclas con polímeros proporcionan la oportunidad de una liberación controlada del péptido. Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

10 Los recipientes también son una parte integral de la formulación de una inyección y pueden considerarse un componente, ya que no hay un recipiente que sea totalmente inerte, o no afecte de algún modo al líquido que contiene, particularmente si el líquido es acuoso. Por lo tanto, la selección de un recipiente para una inyección particular debe basarse en una consideración de la composición del recipiente, así como de la solución, y el tratamiento al que se someterá. La adsorción del péptido a la superficie de vidrio del vial también puede minimizarse, si es necesario, por el uso de vidrio de borosilicato, por ejemplo, vidrio de borosilicato Wheaton Tipo I n° 33 (Wheaton Tipo I-33) o su equivalente (Wheaton Glass Co.). Otros distribuidores de viales de vidrio de borosilicato similares y cartuchos aceptables para su preparación incluyen Kimbel Glass Co., West Co., Bänder Glas GMBH y Forma Vitrum. Las propiedades biológicas y químicas del compuesto pueden estabilizarse por la formulación y liofilización en un vial sérico de borosilicato Wheaton Tipo I-33 a una concentración final de 0,1 mg/ml y 10 mg/ml del compuesto en presencia de manitol al 5%, y Tween 80 al 0,02%.

20 Para formulaciones que se deben suministrar por inyección, para permitir la introducción de una aguja desde una jeringa hipodérmica en un vial de múltiples dosis y proporcionar el resellado tan pronto como se extraiga la aguja, el extremo abierto de cada vial se sella preferentemente con un cierre con tapón de goma mantenido en su sitio por una banda de aluminio.

25 Pueden usarse tapones para viales de vidrio, tales como, West 4416/50, 4416/50 (revestido con Teflón) y 4406/40, Abbott 5139 o cualquier tapón equivalente como cierre para el agente farmacéutico para inyección. Para formulaciones que comprenden agentes peptídicos antiobesidad, estos tapones son compatibles con el péptido así como con los otros componentes de la formulación. Se ha descubierto en esta invención que estos tapones pasan el ensayo de integridad de tapones cuando se ensayan usando patrones de utilización por pacientes, por ejemplo, el tapón puede soportar por lo menos aproximadamente 100 inyecciones. Alternativamente, el péptido puede liofilizarse en viales, jeringas o cartuchos para su posterior reconstitución. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden cargarse en uno o dos cartuchos lobulados, o una o dos jeringas de cámara.

30 Cada uno de los componentes de la formulación farmacéutica descrito anteriormente es conocido en la técnica y se describe en *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 2ª ed., Avis *et al.* Ed., Marcel Dekker, New York, N.Y. 1992.

40 El proceso de preparación para las anteriores formulaciones líquidas generalmente implica las etapas de preparación de compuestos, filtración a esterilidad y carga. El procedimiento de preparación de compuestos implica la disolución de los ingredientes en un orden específico (el conservante seguido del estabilizador/agente de tonicidad, los tampones y el péptido) o la disolución al mismo tiempo.

45 Las formulaciones alternativas, por ejemplo, no parenterales, pueden no requerir esterilización. Sin embargo, si se desea o necesita la esterilización, puede usarse cualquier proceso de esterilización adecuado para desarrollar la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Los procesos de esterilización típicos incluyen filtración, vapor (calor húmedo), calor seco, gases (por ejemplo, óxido de etileno, formaldehído, dióxido de cloro, óxido de propileno, beta-propiolactona, ozono, cloropicrina, metilbromuro del ácido peracético y similares), exposición a una fuente de radiación, y manipulación aséptica. La filtración es el método preferido de esterilización para formulaciones líquidas de la presente invención. La filtración a esterilidad implica la filtración a través de 0,45  $\mu\text{m}$  y 0,22  $\mu\text{m}$  (1 ó 2) que pueden contenerse en serie. Después de la filtración, la solución se carga en viales o recipientes apropiados.

50 En una forma de realización, los agentes antiobesidad deben ser administrados de forma periférica a los sujetos. En algunas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas líquidas usadas en la presente invención están destinadas a la administración parenteral. Las vías adecuadas de administración incluyen intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal y similares. En algunas formas de realización, resulta asimismo preferida la vía de administración subcutánea. En ciertas formas de realización, resulta asimismo preferido el suministro a la mucosa. Estas vías incluyen, de manera no limitativa, las vías oral, nasal, sublingual, pulmonar y bucal que pueden incluir la administración del péptido en forma líquida, semisólida o sólida. Para formulaciones que comprenden agentes peptídicos antiobesidad, la administración mediante estas vías requiere sustancialmente más péptido para obtener los efectos biológicos deseados debido a la biodisponibilidad disminuida en comparación con el suministro parenteral. Además, puede conseguirse un suministro de liberación controlada parenteral formando microcápsulas poliméricas, matrices, soluciones, implantes y dispositivos y administrándolos por vía parenteral o por medios quirúrgicos. Se describen ejemplos de formulaciones de liberación controlada en las patentes US n° 6.368.630, 6.379.704, y 5.766.627. Estas formas de dosificación pueden tener biodisponibilidad inferior debido a la captura de algunos de los péptidos en la matriz polimérica o dispositivo. Véanse, por ejemplo, las patentes US n° 6.379.704, 6.379.703, y 6.296.842.

65 Los compuestos pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria que contiene una cantidad del compuesto con o sin insulina o glucosa (o una fuente de glucosa) que será eficaz en una o múltiples dosis para controlar los efectos de la grelina. Las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos para el tratamiento de enfermedades

## ES 2 325 773 T3

o trastornos asociados a la grelina son las suficientes para tratar, prevenir, o mejorar los efectos fisiológicos de los niveles indeseables de grelina.

5 Como podrán apreciar los expertos en la materia, una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad variará con muchos factores incluyendo la edad y peso del paciente, el estado físico del paciente, la afección a tratar, y otros factores. Una cantidad eficaz de los agentes antiobesidad también variará con la combinación particular administrada. Como se describe en la presente memoria, la administración de los agentes en combinación puede permitir que una cantidad reducida de cualquiera de los agentes administrados sea una cantidad eficaz.

10 Sin embargo, las dosis típicas pueden contener desde un límite inferior de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$  o 100  $\mu\text{g}$  hasta un límite superior de aproximadamente 100  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{g}$ , 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg o 100 mg del compuesto farmacéutico por día. También se contemplan otros intervalos de dosis tales como de 0,1  $\mu\text{g}$  a 1 mg del compuesto por dosis. Las dosis por día pueden suministrarse en dosis unitarias diferentes, proporcionadas de forma continua en un periodo de 24 horas o cualquier parte del periodo de 24 horas. La cantidad de dosis por día puede ser de 1 a aproximadamente 4 por día, aunque podría ser mayor. El suministro continuo puede ser en forma de infusiones continuas. Las dosis y velocidades de infusión ejemplificativas incluyen de 0,005 nmol/kg a aproximadamente 20 nmol/kg por dosis concreta o de aproximadamente 0,01 pmol/kg/min a aproximadamente 10 pmol/kg/min en una infusión continua. Estas dosis e infusiones pueden suministrarse por administración intravenosa (i.v.) o administración subcutánea (s.c.). La dosis/suministro total ejemplificativa de la composición farmacéutica proporcionada i.v. puede ser de aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 8 mg por día, mientras que la dosis/suministro total de la composición farmacéutica dada s.c. puede ser de aproximadamente 6  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 6 mg por día.

15 La leptina y derivados de leptina pueden administrarse, por ejemplo, a una dosificación diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en algunos casos, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg. La administración puede ser por inyección de una única dosis o en dosis divididas.

El rimonabant puede administrarse, por ejemplo, a una dosificación diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, en algunos casos de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal en una única dosis o en dosis divididas de 2 a 3 veces por día, o en forma de liberación sostenida.

30 Los Ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

### Ejemplos

#### 35 Ejemplo 1

La obesidad inducida por la dieta (DIO) en la rata Sprague-Dawley es un modelo valioso para el estudio de la obesidad y la regulación de la homeostasis energética. Estas ratas se desarrollaron a partir de una línea de ratas (CrI:CD<sup>®</sup>(SD)BR) que son propensas a la obesidad con una dieta relativamente elevada en grasa y energía. Véase, por ejemplo, Levin (1994) Am. J. Physiol. 267:R527-R535, Levin *et al.* (1997) Am. J. Physiol. 273:R725-R730. Se obtuvieron ratas macho DIO de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). Las ratas se alojaron individualmente en jaulas rectangulares a 22°C en un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas. Las ratas se mantuvieron *ad libitum* con una dieta moderadamente elevada en grasas (32% kcal de la grasa; Research Diets D1226B) durante 6-7 45 semanas antes del tratamiento con fármaco. Al final del periodo de engorde (antes de la administración de fármaco), los animales típicamente consiguen un peso corporal medio de aproximadamente 500 g.

Los animales DIO se dividieron en cuatro grupos de tratamiento. A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea (DURECT Corp., Cupertino, CA) diseñada para suministrar vehículo, leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), 50 amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) o leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) + amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días. Como se describe en la presente memoria, la amilina actúa sobre las estructuras del rombencéfalo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal y la leptina actúa sobre las estructuras de hipotálamo implicadas en la ingesta de alimentos y/o la modulación del peso corporal. La ingesta de alimentos y el peso corporal se registraron diariamente. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX). Se usó calorimetría indirecta para medir los cambios en el gasto de energía en los días 4, 5 y 6 del tratamiento con fármaco (Oxymax; Columbus Instruments, Columbus, OH). Todos los datos se representan como la media  $\pm$  ETM. Se usaron análisis de la varianza (ANOVA) y ensayos *post-hoc* para ensayar la diferencia de grupos. Un valor  $P < 0,05$  se consideraba significativo. El análisis estadístico y la representación se realizaron usando PRISM<sup>®</sup> 4 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). En algunos estudios, se usó 60 SYSTAT<sup>®</sup> para Windows (Systat Software, Inc., Point Richmond CA) para el análisis.

Las Figuras 1 y 2 muestran los efectos de amilina y leptina sobre la ingesta acumulativa de alimentos y los cambios totales en el peso corporal después de 14 días de administración de fármaco. Es de particular interés que (1) la leptina, el agente que actúa en el prosencéfalo, era ineficaz por sí misma en este modelo de obesidad (no tenía efecto sobre la ingesta de alimentos o el peso corporal), y (2) la ratas tratadas con la combinación de amilina y leptina consumían significativamente menos alimento y perdían significativamente más peso con relación a las ratas tratadas con vehículo o amilina o leptina solo ( $p < 0,05$ ; letras diferentes indican que los grupos diferían significativamente entre sí).

Se observaron efectos similares en la composición corporal. La Figura 3 representa los cambios en la grasa corporal producidos por los tratamientos y la Figura 4 representa los cambios en las proteínas corporales producidos por los tratamientos. La pérdida de grasa en los animales tratados con la combinación de amilina + leptina era significativamente mayor que la de animales tratados con agente individual o vehículo ( $p < 0,05$ ). Estos cambios en la grasa corporal no estaban acompañados por disminuciones significativas en el tejido magro ( $p > 0,05$ ; Figura 4).

La Figura 5 representa los cambios en el gasto de energía durante el ciclo oscuro de los grupos de tratamiento. Aunque la reducción en la ingesta de alimentos y el peso corporal inducida por fármacos (o la dieta) a menudo está acompañada por una ralentización del índice metabólico (Calor, kcal/h/kg), las ratas tratadas con la combinación de leptina y amilina tenían un índice metabólico significativamente mayor durante el ciclo oscuro con relación a los otros grupos ( $p < 0,05$ ). Por tanto, abordar simultáneamente los centros de la alimentación del rombencéfalo y el prosencéfalo con la combinación de amilina + leptina provocaba una reducción en la ingesta de alimentos, el peso corporal y la grasa corporal significativa y sostenida aumentando al mismo tiempo el índice metabólico. Además, las reducciones en el peso corporal y la grasa corporal no estaban acompañadas por una reducción en la masa de tejido magro.

#### Ejemplo 2

Se realizó otra serie de experimentos para examinar adicionalmente los efectos sinérgicos de la combinación de amilina y leptina sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal. Se obtuvieron ratas DIO (Levin) de la misma estirpe de Charles Rivers Labs para estos estudios. Estas ratas se desarrollaron por Barry Levin a partir de una línea de ratas CrI:CD<sup>®</sup>(SD)BR que eran propensas a la obesidad con una dieta relativamente elevada en grasa y energía. Se alojaron individualmente en jaulas rectangulares a 22°C en un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas. Las ratas se mantuvieron *ad-libitum* con una dieta moderadamente elevada en grasas (32% kcal de la grasa; Research Diets D1226B) durante aproximadamente 6 semanas antes del tratamiento con fármaco y en todo el experimento con la excepción de los controles de alimentación pareada (PF). Las ratas PF estaban restringidas a la ingesta del grupo tratado con amilina. Antes de la administración de fármaco las ratas habían obtenido típicamente un peso corporal medio de 500 g.

Los animales se dividieron en grupos de tratamiento contra-equilibrados para el peso corporal y se les implantaron minibombas osmóticas subcutáneas (Durect Corp., Cupertino, CA). A cada rata se le implantaron dos minibombas que contenían fármaco o el vehículo apropiado. La amilina de rata (AC0128; Lot n° 28) se disolvió en DMSO al 50% en agua estéril y la leptina murina (Peprotech, n° catalog. 450-31) se disolvió en agua estéril. Las bombas estaban diseñadas para suministrar vehículo, amilina a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  o leptina murina a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  durante un periodo de 14 días.

A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea (DURECT Corp., Cupertino, CA) diseñada para suministrar vehículo, leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) o leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) + amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registraron diariamente. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX). Para las mediciones de la composición corporal, las ratas se colocaron brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que después se insertó en una máquina de RMN de roedores especializada. Las ratas se exploraron antes del implante de la bomba y en el día final del experimento. Esto permitió el cálculo de los cambios en los gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, los gramos de grasa corporal después del tratamiento - los gramos de grasa corporal al inicio = cambio en los gramos de grasa corporal) y los cambios en el % de composición corporal para la grasa y el tejido magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal al inicio = cambio en el % de grasa corporal).

El gráfico de la Figura 6A representa los cambios corregidos por el vehículo en porcentaje de peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. En este experimento, la administración de leptina provocó una disminución global del 2% en el peso corporal y la administración de amilina provocó una disminución global del 6% en el peso corporal. Notablemente, el porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y leptina era de aproximadamente el 12%, un efecto mayor que el efecto combinado de los agentes individuales administrados solos. Por consiguiente, la amilina y la leptina actuaban sinérgicamente para reducir el peso corporal. Las Figuras 6B y 6C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. De nuevo, la reducción en la grasa corporal como resultado de la combinación de agentes es mayor que la reducción combinada en la grasa corporal como resultado de los agentes individuales. Estos cambios en la grasa corporal no estaban acompañados por disminuciones en las proteínas corporales sino más bien un una ganancia en el porcentaje de proteínas. Estos resultados sostienen el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

Es conocido que la amilina tiene un efecto anoréctico sobre un receptor. Para examinar el efecto de la amilina + leptina en el contexto de un efecto anoréctico de amilina, se realizó un experimento de alimentación pareada. Se establecieron ratas DIO y grupos de tratamiento con fármaco como se ha descrito anteriormente. Las ratas DIO en los grupos de tratamiento con vehículo, amilina, y amilina + leptina tenían acceso *ad libitum* al alimento, mientras que la ingesta en el tratamiento con leptina de alimentación pareada estaba restringida a la cantidad consumida por el grupo tratado con amilina. El peso corporal se registró diariamente durante las dos semanas de tratamiento. Como se muestra en la Figura 7, el grupo de tratamiento con amilina y el grupo de tratamiento con leptina de alimentación pareada

## ES 2 325 773 T3

tenían ambos una disminución de aproximadamente el 6% en el peso corporal con relación al control de vehículo. Este resultado es coherente con el resultado previo de leptina que tiene poco o ningún efecto sobre el peso corporal en los animales DIO. La combinación de amilina + leptina provoca una disminución de aproximadamente el 12% en el peso corporal con relación al control de vehículo. Por consiguiente, el experimento de alimentación pareada demuestra que la combinación de amilina + leptina reduce el peso corporal mayor que el conferido por una restricción calórica.

### Ejemplo 3

Como se analiza en la presente memoria, los niveles séricos de leptina en la mayoría de los seres humanos con obesidad son elevados, y se cree que existe un estado de resistencia a la leptina en estos individuos. Los niveles plasmáticos de leptina y la resistencia a la leptina se examinaron en ratas normales Harlan Sprague-Dawley (HSD) y en ratas propensas a DIO.

Las ratas propensas a DIO y normales HSD se dividieron en tres grupos de tratamiento. A dos grupos se les implantaron minibombas osmóticas subcutáneas (DURECT Corp., Cupertino, CA) diseñadas para suministrar vehículo o amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) y el tercer grupo estaba alimentado de forma pareada a la cantidad consumida por el grupo tratado con amilina durante un periodo de 14 días. Los niveles séricos de leptina se determinaron por inmunoensayos usando un kit comercial (Linco Research, Inc., St. Charles, MO). Como se muestra en la Figura 8, el nivel sérico de leptina en los animales propensos a DIO es aproximadamente tres veces mayor que el de los animales normales HSD. Por tanto, las ratas propensas a DIO eran hiperleptinémicas. Tanto el tratamiento con amilina como la restricción calórica a la cantidad de alimento ingerido por los animales tratados con amilina redujeron significativamente los niveles plasmáticos de leptina tanto en los animales propensos a DIO como en los normales.

Las ratas normales, delgadas HSD se dividieron en dos grupos de tratamiento. A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea (DURECT Corp., Cupertino, CA) diseñada para suministrar vehículo o leptina (500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días y se registró el peso corporal semanalmente. Como se muestra en la Figura 9, la dosis ineficaz de leptina (500  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ ) en animales propensos a DIO, provocaba una reducción en el peso corporal significativa y sostenida en ratas normales HSD. Los animales propensos a DIO descritos en la presente memoria parecen resistentes al efecto reductor del peso de la leptina.

### Ejemplo 4

Para demostrar los efectos de la combinación de amilina y un inhibidor de la recaptación serotoninérgica/noradrenérgica sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal, se engordaron ratas macho DIO y se dividieron en cuatro grupos de tratamiento, como se ha descrito en el Ejemplo 2. La amilina de rata se disolvió en DMSO en agua estéril y la sibutramina se disolvió en agua estéril. A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea diseñada para suministrar vehículo, sibutramina (3  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ ) o amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registraron diariamente. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Écho Medical Systems, Houston, TX). Para las mediciones de la composición corporal, las ratas se colocaron brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que después se insertó en una máquina de RMN de roedores especializada. Las ratas se exploraron antes del implante de la bomba y en el día final del experimento. Esto permitió el cálculo de los cambios en los gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, los gramos de grasa corporal después del tratamiento - los gramos de grasa corporal al inicio = cambio en los gramos de grasa corporal) y los cambios en el % de composición corporal para la grasa y el tejido magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal al inicio = cambio en el % de grasa corporal).

El gráfico de la Figura 10A representa los cambios corregidos por el vehículo en el porcentaje del peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. La administración de sibutramina sola y administración de amilina sola provocó una disminución de aproximadamente el 6% en el peso corporal. El porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y sibutramina era de aproximadamente el 12%. Las Figuras 10B y 10C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. La pérdida de masa grasa era evidente con el tratamiento de amilina sola o sibutramina sola, y se obtuvo un efecto sinérgico cuando se administraron tanto amilina como sibutramina en combinación (Fig. 10B). La administración de amilina sola provocó un aumento en la masa magra (proteína). La masa magra (proteína) estaba relativamente inalterada cuando se administraba sibutramina sola o en combinación con amilina (Fig. 10C). Estos resultados sostienen el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

También se ensayó la combinación de amilina y un agonista catecolaminérgico, fentermina, para los efectos sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal. La fentermina se conoce clásicamente como un agonista catecolaminérgico ya que realmente activa los receptores NA/5-HT. Se engordaron ratas macho DIO y se dividieron en cuatro grupos de tratamiento, como se ha descrito anteriormente. A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea y/o se le insertó una sonda oral, diseñada para suministrar vehículo, fentermina (10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ ), amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) o fentermina (10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ ) + amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días. La minibomba contenía vehículo (DMSO al 50% en agua) o amilina mientras que la sonda oral administraba agua estéril o fentermina. El peso corporal se registró diariamente y la composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN.

## ES 2 325 773 T3

El gráfico de la Figura 11A representa los cambios corregidos por el vehículo en el porcentaje de peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. La administración de fentermina sola provocó una disminución de aproximadamente el 5% en el peso corporal y la administración de amilina sola provocó una disminución de aproximadamente el 7% en el peso corporal. El porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y fentermina era de aproximadamente el 12%. Las Figuras 11B y 11C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. Era evidente una cantidad moderada de pérdida de masa grasa con el tratamiento de fentermina sola y era evidente una cantidad mayor de pérdida de masa grasa con el tratamiento de amilina sola. Cuando se administraban amilina y fentermina en combinación, se obtuvo un efecto sinérgico (Fig. 11B). La masa magra (proteína) estaba inalterada o tendía a perderse cuando se administraba fentermina sola. La administración de amilina sola conservaba la masa magra (proteína) y la combinación de amilina y fentermina tendía a tener el mayor aumento en la masa magra (proteína), incluso cuando los animales experimentaban una pérdida de aproximadamente el 12% en el peso corporal (Fig. 11C). Estos resultados sostienen el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

### Ejemplo 5

Para demostrar los efectos de la combinación de amilina y un antagonista de CB-1 sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal, se obtuvieron ratas DIO (Levin) de la misma estirpe de Charles Rivers Labs. Estas ratas se desarrollaron por Barry Levin a partir de una línea de ratas CrI:CD<sup>®</sup>(SD)BR que eran propensas a la obesidad con una dieta relativamente elevada en grasa y energía. Se alojaron individualmente en jaulas rectangulares a 22°C en un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas. Las ratas se mantuvieron *ad-libitum* con una dieta moderadamente elevada en grasas (32% kcal de la grasa; Research Diets D1226B) durante aproximadamente 6 semanas antes del tratamiento con fármaco y en todo el experimento. Antes de la administración de fármaco las ratas habían obtenido típicamente un peso corporal medio de 500 g. Las ratas se habituaron a una sonda oral durante 1 semana antes del tratamiento. Se administró rimonabant a un intervalo de dosis (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 mg/kg/día) por sonda oral. Se administró amilina (disuelta en DMSO al 50% en agua estéril) o vehículo por una minibomba (100 µg/kg/día). El rimonabant siempre se suministraba justo antes apagar las luces. La ingesta de alimento y el peso corporal se midieron 1 y 2 semanas después del tratamiento. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX). Para las mediciones de la composición corporal, las ratas se colocaron brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que después se insertó en una máquina de RMN de roedores especializada. Las ratas se exploraron antes del implante de la bomba y en el día final del experimento. Esto permitió el cálculo de los cambios en los gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, los gramos de grasa corporal después del tratamiento - los gramos de grasa corporal al inicio = cambio en los gramos de grasa corporal) y los cambios en el % de composición corporal para la grasa y el tejido magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal al inicio = cambio en el % de grasa corporal).

El gráfico de la Figura 12A representa los cambios corregidos por el vehículo en el porcentaje de peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. La administración de rimonabant solo provocó una disminución de aproximadamente el 4% en el peso corporal y la administración de amilina sola provocó una disminución de aproximadamente el 6% en el peso corporal. El porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y rimonabant fue de aproximadamente el 11%. Las Figuras 12B y 12C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. Era evidente una pérdida de masa grasa con el tratamiento de amilina sola o rimonabant solo, y se obtuvo un efecto sinérgico cuando se administraron tanto amilina como rimonabant en combinación (Fig. 12B). La administración de amilina sola, rimonabant solo, y amilina + rimonabant en combinación provocó un aumento relativamente equivalente en la masa magra (proteína) (Fig. 12C). Estos resultados sostienen el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

En otro ensayo, el antagonista de CB-1 rimonabant (AC163720) se administró en combinación con amilina. Se mantuvieron ratas propensas a DIO *ad-libitum* con una dieta moderadamente elevada en grasas (32% kcal de la grasa; Research Diets D1226B) durante 6 semanas antes del tratamiento con fármaco. Al final del periodo de engordamiento típicamente tienen un peso corporal medio de 500 g. Las ratas entonces se dividieron en grupos de tratamiento y se les implantó una minibomba subcutánea (Durect Corp) y se les insertó una sonda oral. La minibomba contenía vehículo (DMSO al 50% en agua) o amilina (100 µg/kg/día) mientras que la sonda oral administraba agua estéril o un intervalo de dosis de rimonabant (AC163720) (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 mg/kg/día). El cambio en el peso corporal después de 2 semanas se representa en la Figura 13 y dos de estas combinaciones (en un círculo) están destacadas en las Figuras 14A y 14B con mayor detalle.

### Ejemplo 6

Para demostrar los efectos de la combinación de amilina y un análogo de exendina, <sup>14</sup>Leu-exendina-4: His Gly Glu Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser (SEC ID N° 190), sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal, se engordaron ratas macho DIO y se dividieron en cuatro grupos de tratamiento, como se ha descrito anteriormente. Antes de la administración de fármaco las ratas habían obtenido típicamente un peso corporal medio de 500 g. Se administró el análogo de exendina-4 por la minibomba en un intervalo de dosis (0,3, 1, 3, 10, 30 µg/kg/día). Se administró amilina (disuelta en DMSO al 50% en agua) o vehículo por la minibomba (100 µg/kg/día). El peso corporal y la ingesta de

## ES 2 325 773 T3

alimentos se registraron diariamente. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX). Para las mediciones de la composición corporal, las ratas se colocaron brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que después se insertó en una máquina de RMN de roedores especializada. Las ratas se exploraron antes del implante de la bomba y en el día final del experimento. Esto permitió el cálculo de los cambios en los gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, los gramos de grasa corporal después del tratamiento - los gramos de grasa corporal al inicio = cambio en los gramos de grasa corporal) y los cambios en el % de composición corporal para la grasa y el tejido magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal al inicio = cambio en el % de grasa corporal).

El gráfico de la Figura 15A representa los cambios corregidos por el vehículo en el porcentaje de peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. La administración del análogo de exendina-4 solo y la administración de amilina sola provocaron cada uno una disminución de aproximadamente el 6% en el peso corporal. El porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y análogo de exendina-4 fue de aproximadamente el 12%. Las Figuras 16B y 15C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. Fue evidente una pérdida de masa grasa con el tratamiento del análogo de exendina-4 solo. La administración de amilina sola y amilina + análogo de exendina-4 en combinación provocó una disminución relativamente equivalente en la masa grasa (Fig. 15B). La administración de amilina sola, del análogo de exendina-4 solo, y amilina + AC3174 en combinación provocó un aumento relativamente equivalente en la masa magra (proteína) (Fig. 15C). Estos resultados sostienen el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

### Ejemplo 7

Para demostrar los efectos de la combinación de amilina y agonistas de PYY sobre los cambios en el peso corporal y la composición corporal, se engordaron ratas macho DIO y se dividieron en cuatro grupos de tratamiento, como se ha descrito anteriormente. A cada grupo se le implantó una minibomba osmótica subcutánea diseñada para suministrar vehículo, PYY(3-36) (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ), amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) o PYY(3-36) (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) + amilina (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) durante un periodo de 14 días. Se administró PYY(3-36) por la minibomba a un intervalo de dosis (100, 200, 400, 800, 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ). Se administró amilina a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (disuelta en DMSO al 50% en agua estéril), PYY(3-36) (disuelto en DMSO al 50% en agua estéril) o vehículo por la minibomba. La ingesta de alimento y el peso corporal se registraron diariamente. La composición corporal se midió antes y después del tratamiento con fármaco usando RMN (Echo Medical Systems, Houston, TX). Para las mediciones de la composición corporal, las ratas se colocaron brevemente (~1 min) en un tubo de plexiglás bien ventilado que después se insertó en una máquina de RMN de roedores especializada. Las ratas se exploraron antes del implante de la bomba y en el día final del experimento. Esto permitió el cálculo de los cambios en los gramos reales de grasa y tejido magro seco (por ejemplo, los gramos de grasa corporal después del tratamiento - los gramos de grasa corporal al inicio = cambio en los gramos de grasa corporal) y los cambios en el % de composición corporal para la grasa y el tejido magro seco (por ejemplo, % de grasa corporal después del tratamiento - % de grasa corporal al inicio = cambio en el % de grasa corporal).

El gráfico de la Figura 16A representa los cambios corregidos por el vehículo en el porcentaje de peso corporal de los grupos de tratamiento durante las dos semanas de tratamiento. La administración de PYY(3-36) solo provocó una disminución de aproximadamente el 9% en el peso corporal y la administración de amilina sola provocó una disminución de aproximadamente el 7% en el peso corporal. El porcentaje de disminución en el peso corporal en respuesta a la administración de una combinación de amilina y PYY(3-36) fue de aproximadamente el 15%. Las Figuras 16B y 16C representan los cambios en la grasa corporal y los cambios en las proteínas corporales, respectivamente, producidos después de las dos semanas de tratamiento. Resultó evidente una cantidad creciente de pérdida de grasa con el tratamiento de PYY(3-36) solo, amilina sola, y amilina + PYY(3-36) en combinación (Fig. 16B). La administración de amilina sola y amilina + PYY(3-36) en combinación provocó un aumento en la masa magra (proteína) (Fig. 16C). Estos resultados respaldan el efecto metabólico de la combinación de agentes así como el efecto reductor del peso.

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de un primer agente antiobesidad seleccionado de entre amilina, un agonista de amilina o un análogo de amilina para la preparación de un medicamento para reducir el peso corporal en un sujeto humano, para tratar la obesidad o reducir la disponibilidad de nutrientes, en la que el medicamento debe ser administrado en combinación con un segundo agente antiobesidad seleccionado de entre leptina, un derivado de leptina o un agonista de leptina, en la que los agentes deben ser administrados en cantidades eficaces para reducir el peso corporal del sujeto en por lo menos 10%, y en la que la concentración de leptina sérica del sujeto es superior a 10 ng/ml antes de la administración de los agentes antiobesidad.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para reducir el peso corporal en un sujeto.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para reducir la disponibilidad de nutrientes.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para tratar la obesidad.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los agentes antiobesidad en combinación deben ser administrados por administración simultánea, concurrente o secuencial.
- 20 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el segundo agente antiobesidad se selecciona de entre leptina humana recombinante y metionil leptina humana recombinante.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el primer agente antiobesidad es la pramlintida.
- 25 8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el sujeto presenta un IMC por encima de 25.
9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que los agentes antiobesidad en combinación deben ser administrados simultáneamente.
- 30 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la amilina o el agonista de amilina deben ser administrados 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 21 días o 28 días o más antes de la leptina o el agonista de leptina.
- 35 11. Utilización según la reivindicación 10, en la que, antes de la administración de la leptina o del agonista de leptina, debe ser administrada la amilina o el agonista de amilina al sujeto hasta que la concentración de leptina sérica en el sujeto sea de 4 ng/ml o inferior.
- 40 12. Kit que comprende un primer agente antiobesidad seleccionado de entre amilina, un agonista de amilina o un análogo de amilina y un segundo agente antiobesidad seleccionado de entre una leptina, un derivado de leptina o un agonista de leptina para reducir el peso corporal en un sujeto humano, para tratar la obesidad o reducir la disponibilidad de nutrientes, en el que los agentes deben ser administrados en combinación, y en el que los agentes deben ser administrados en cantidades eficaces para reducir el peso corporal del sujeto por lo menos 10%, y en el que la concentración de leptina sérica del sujeto es superior a 10 ng/ml antes de la administración de los agentes antiobesidad.
- 45 13. Kit según la reivindicación 12, en el que el kit es para reducir el peso corporal en un sujeto.
14. Kit según la reivindicación 12, en el que el kit es para reducir la disponibilidad de nutrientes.
- 50 15. Kit según la reivindicación 12, en el que el kit es para tratar la obesidad.
16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que los agentes antiobesidad en combinación deben ser administrados por administración simultánea, concurrente o secuencial.
- 55 17. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que el segundo agente antiobesidad se selecciona de entre leptina humana recombinante y metionil leptina humana recombinante.
- 60 18. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en el que el primer agente antiobesidad es la pramlintida.

Fig. 1

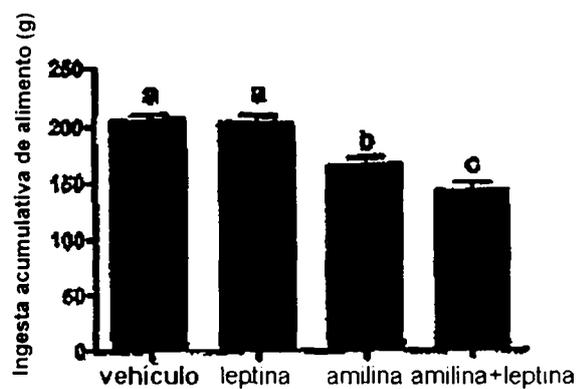


Fig. 2

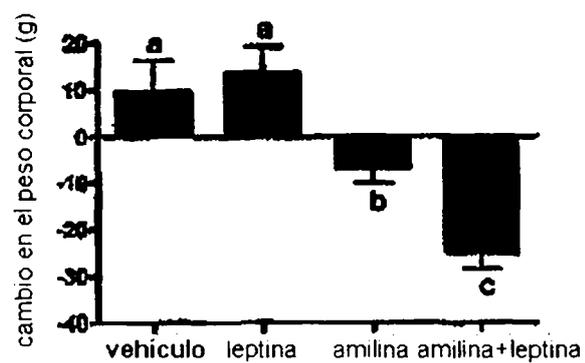


Fig. 3

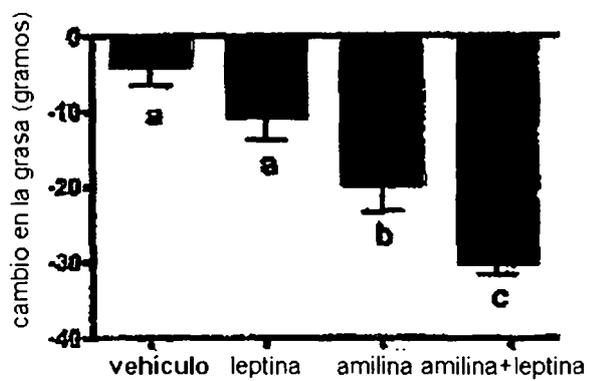


Fig. 4

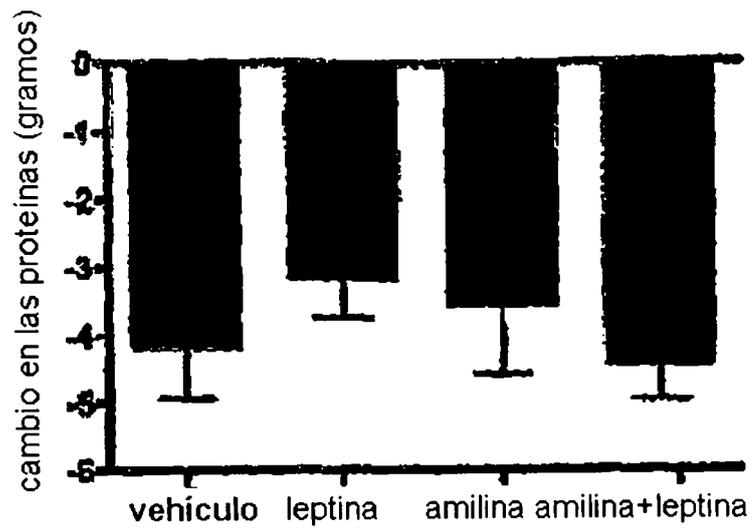


Fig. 5

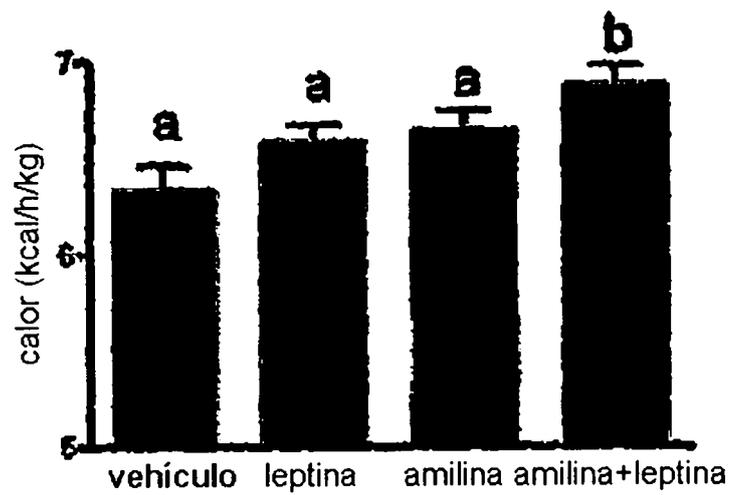


Fig. 6A

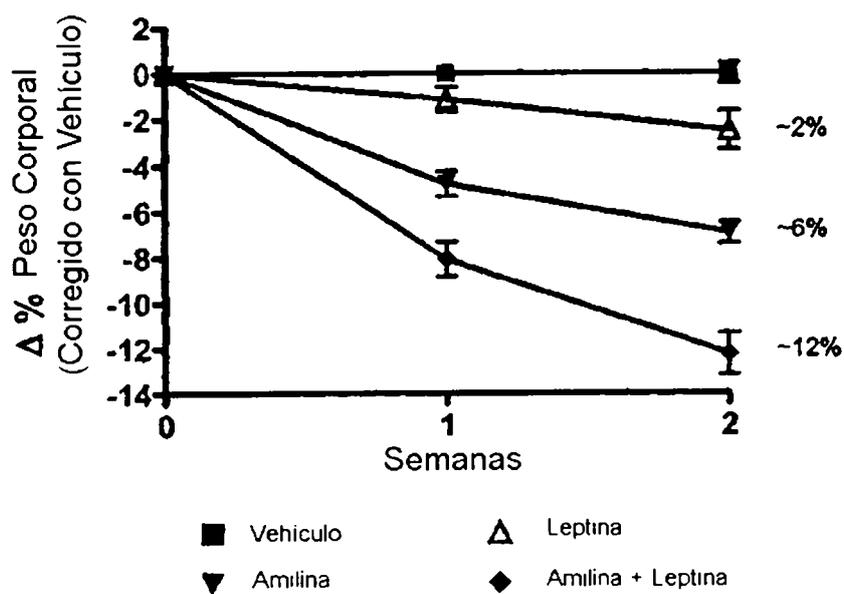


Fig. 6B

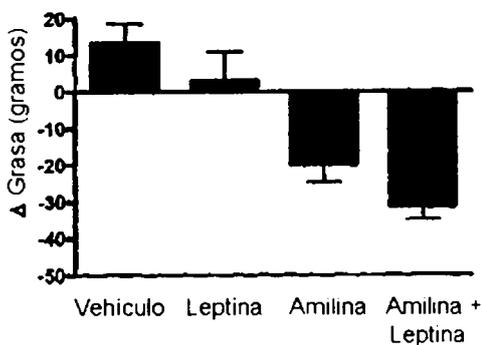


Fig. 6C

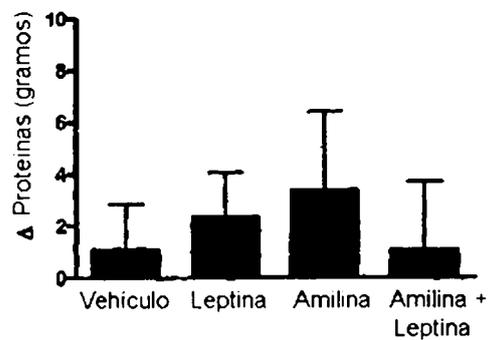


Fig. 7

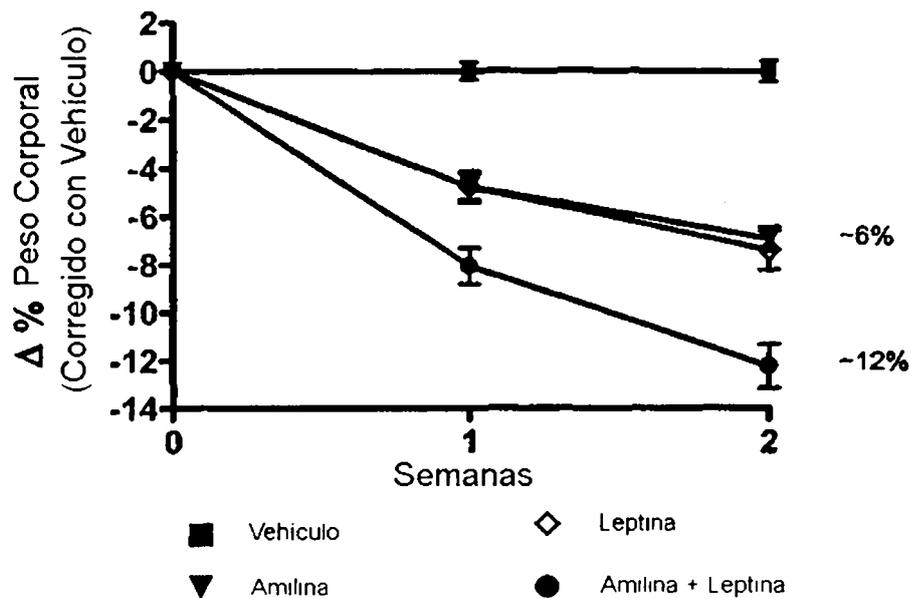


Fig. 8

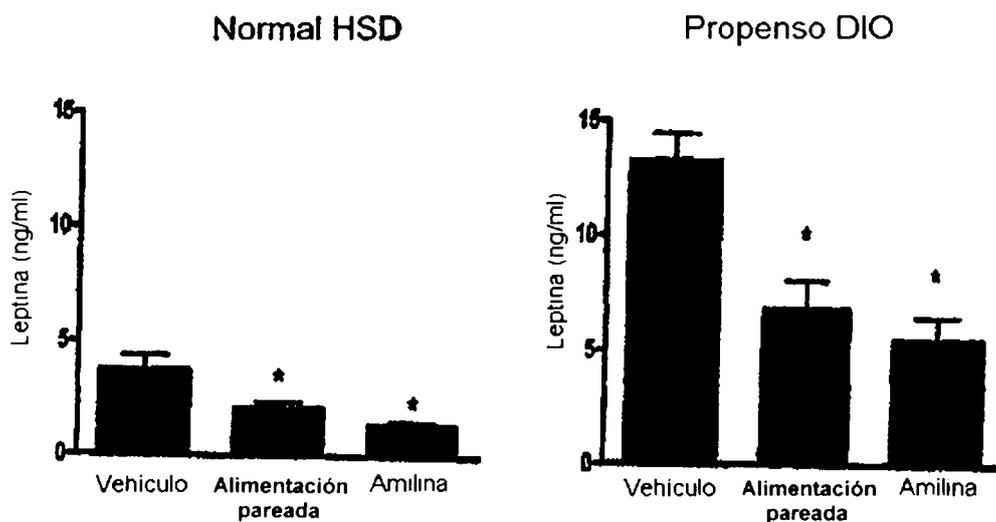


Fig. 9A

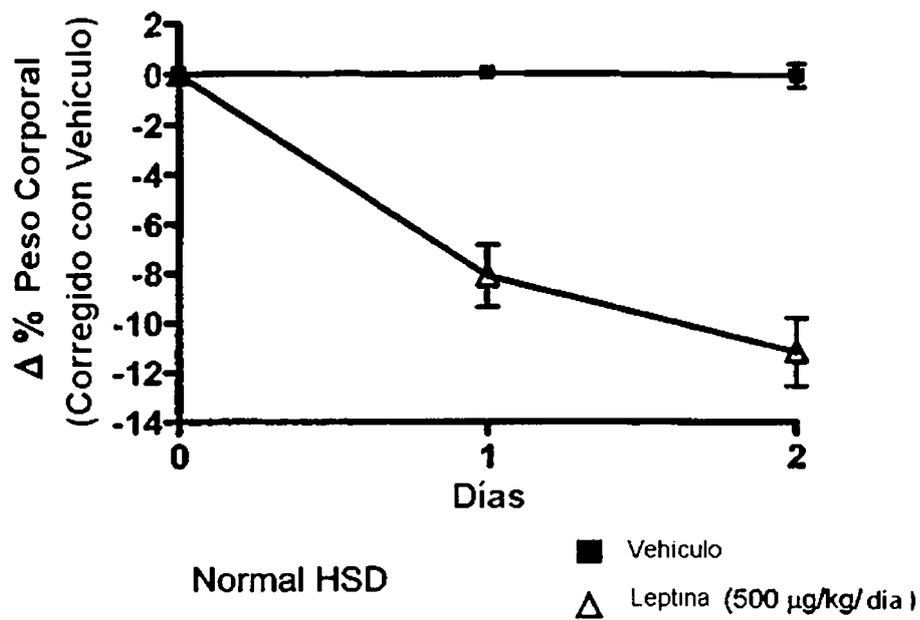


Fig. 9B

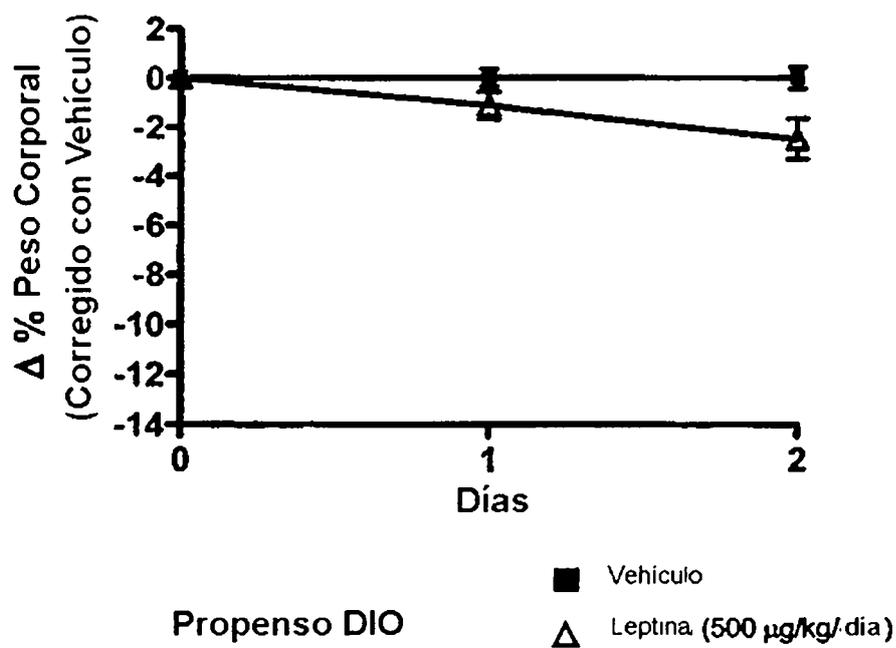


Fig. 10A

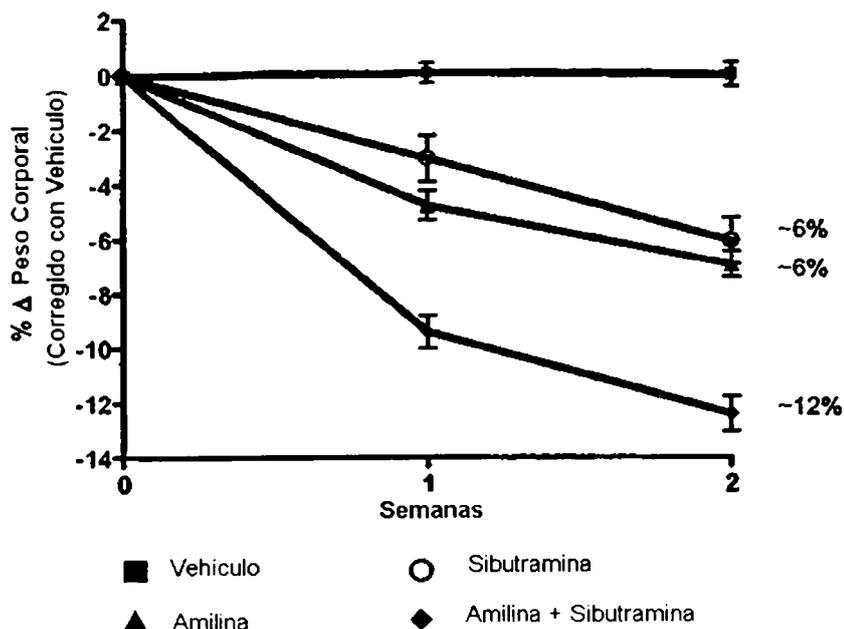


Fig. 10B

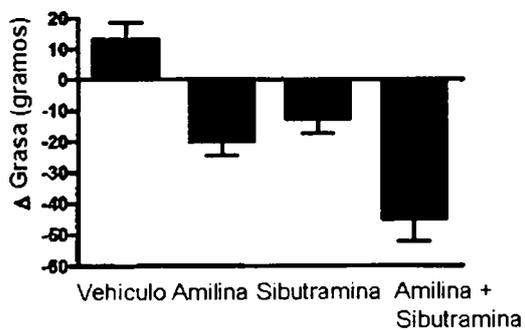


Fig. 10C

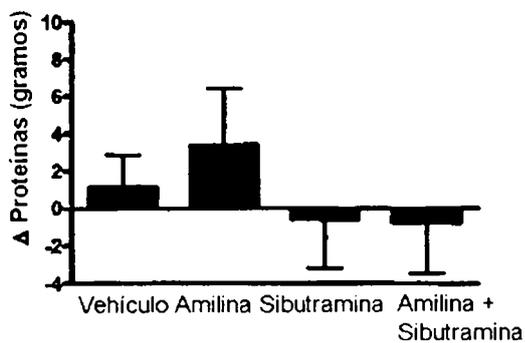


Fig. 11A

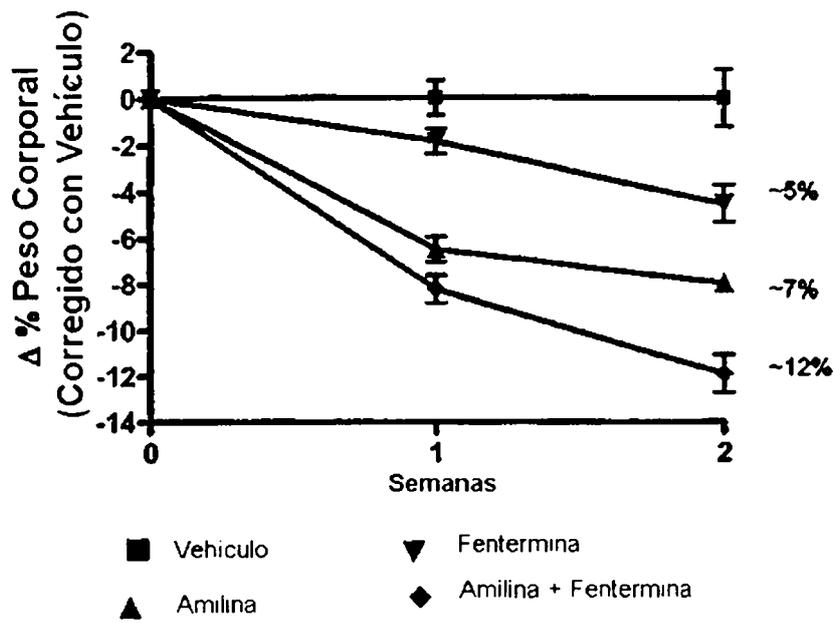


Fig. 11B

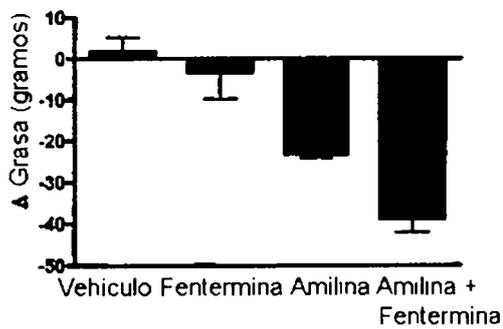


Fig. 11C

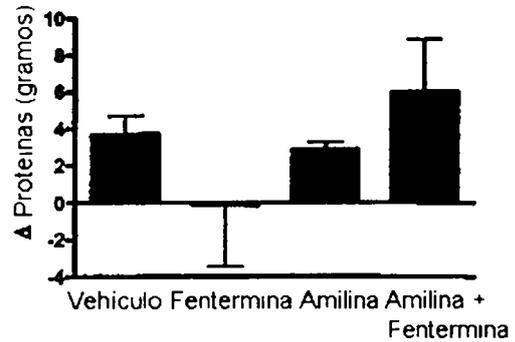


Fig. 12A

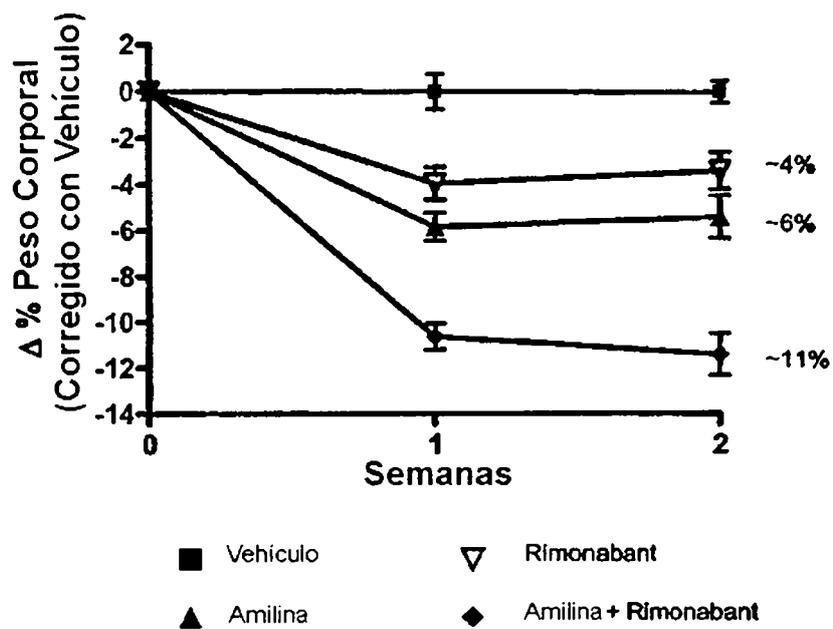


Fig. 12B

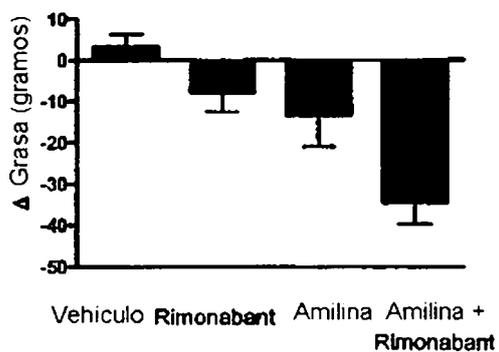


Fig. 12C

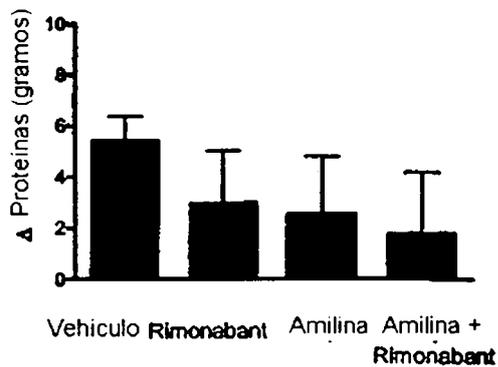


Fig. 13

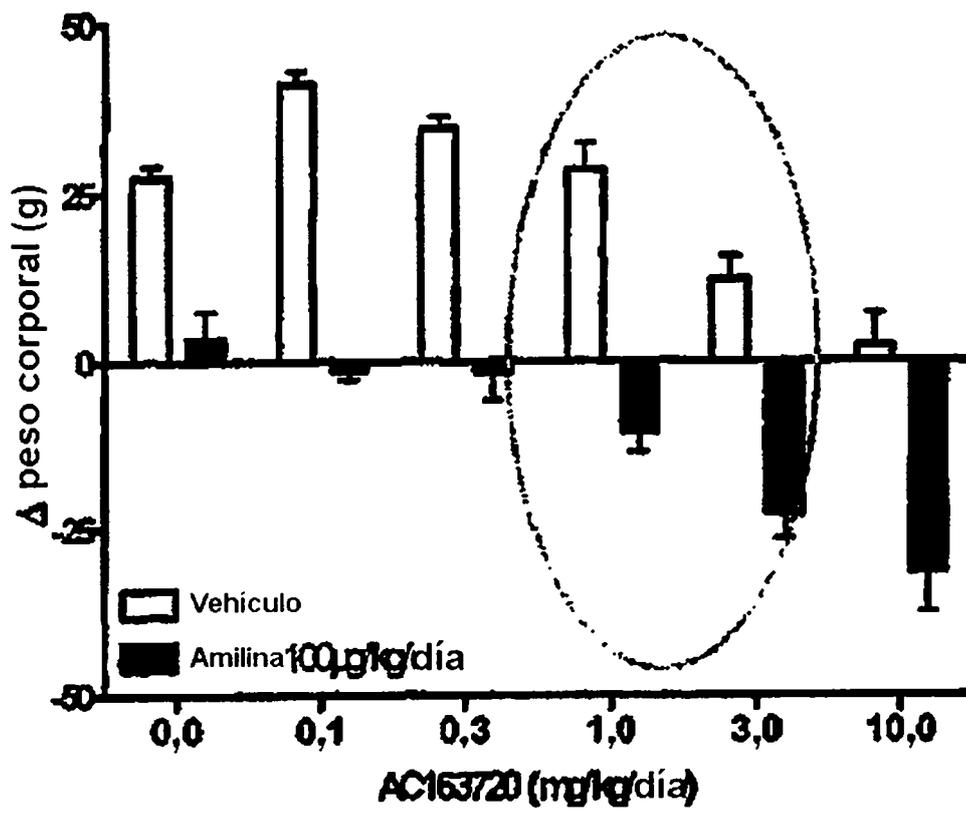


Fig. 14A

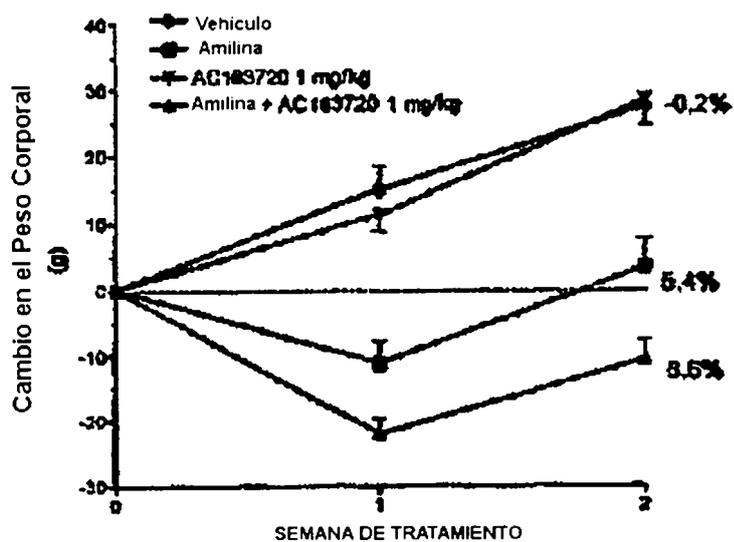


Fig. 14B

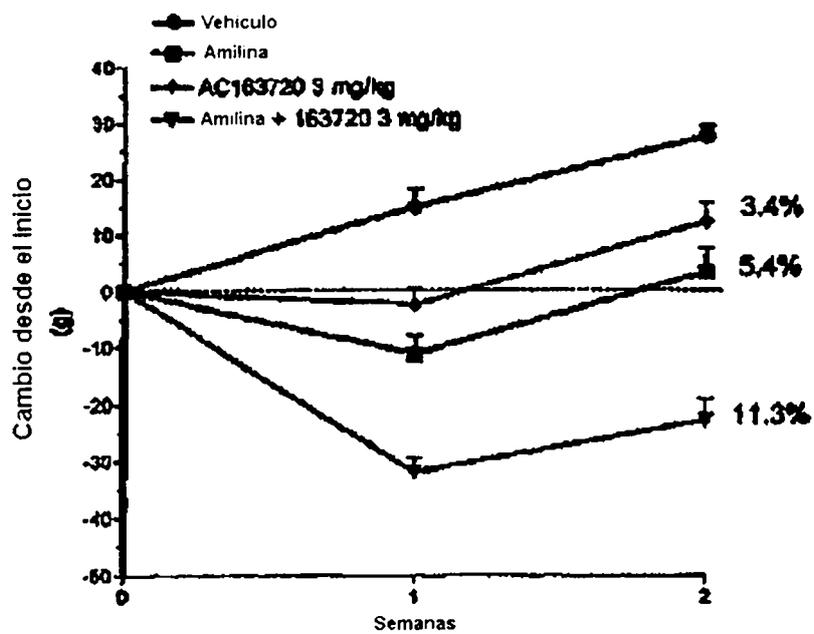


Fig. 15A

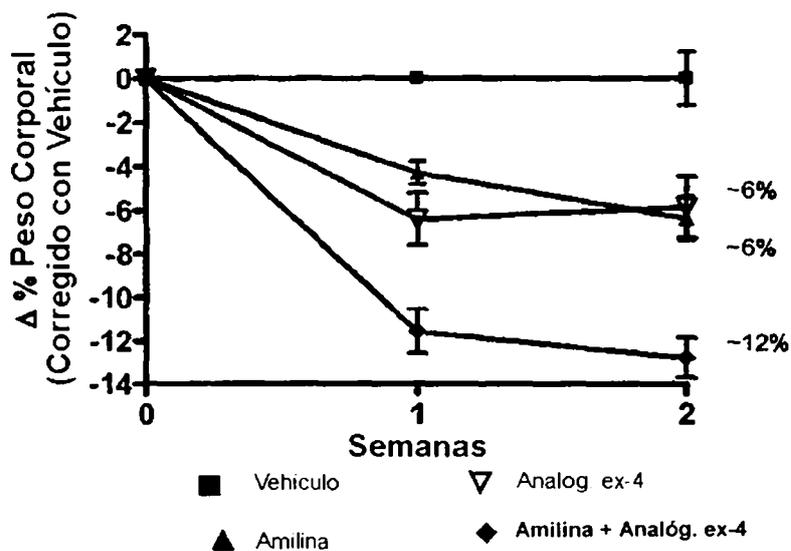


Fig. 15B

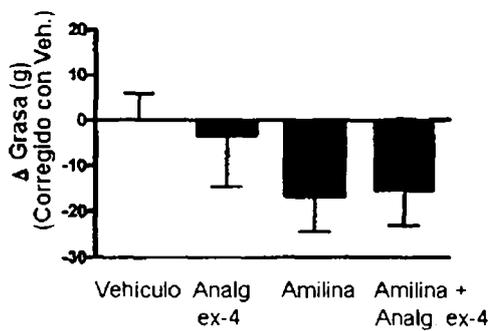


Fig. 15C

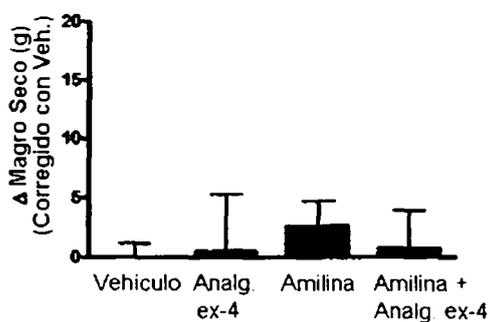


Fig. 16A

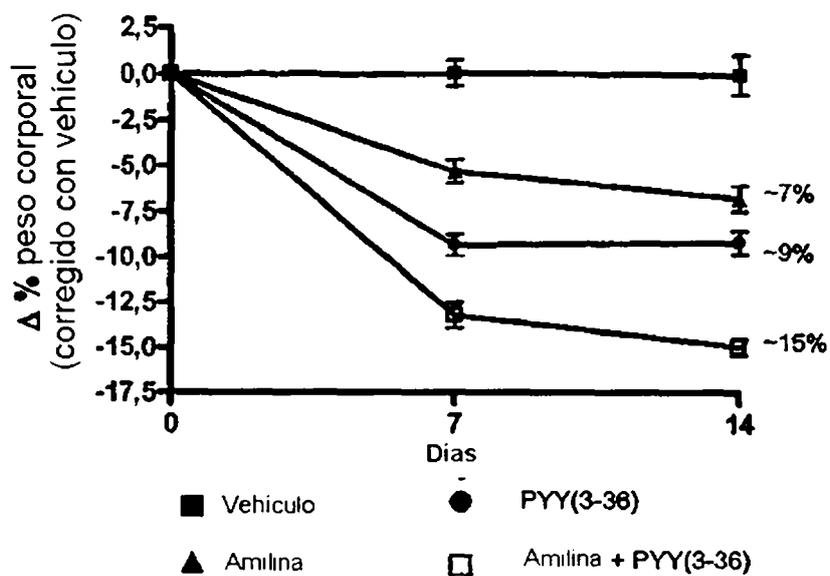


Fig. 16B

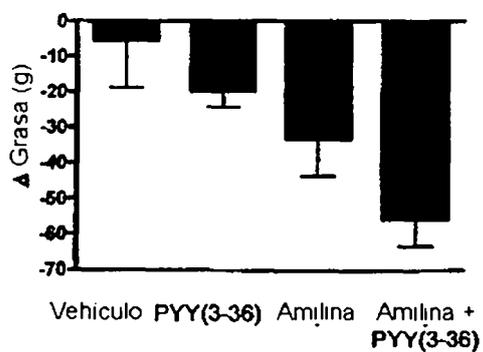


Fig. 16C

