



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 595**

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99906782 .0**
96 Fecha de presentación : **05.02.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1053001**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2000**

54 Título: **Nuevos compuestos de actividad mixta de la amilina.**

30 Prioridad: **13.02.1998 US 74746 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2011

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

72 Inventor/es: **Beeley, Nigel, R., A.;**
Prickett, Kathryn, S. y
Beaumont, Kevin

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos que inhiben determinadas actividades de la amilina pero que también actúan como agonistas de la amilina con respecto a otras actividades de la amilina. Estos compuestos resultan útiles para tratar alteraciones del metabolismo energético en los mamíferos que comprenden de manera no limitativa la diabetes mellitus, incluyendo la diabetes de tipo I y la diabetes de tipo II, la tolerancia alterada a la glucosa, la resistencia a la insulina y el síndrome X.

ANTECEDENTES E INTRODUCCIÓN A LA INVENCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica grave que se define a partir de la presencia de niveles crónicamente elevados de glucosa sanguínea (hiperglucemia). Este estado de hiperglucemia es el resultado de una falta relativa o absoluta de actividad de la hormona peptídica insulina. La insulina es producida y secretada por las células β del páncreas. Se informa que la insulina estimula la utilización de la glucosa, la síntesis de proteínas y la formación y almacenamiento glucídico en forma de glucógeno. La glucosa se almacena en el cuerpo en forma de glucógeno, una forma de glucosa polimerizada, que puede convertirse nuevamente en glucosa para satisfacer los requisitos metabólicos. Bajo condiciones normales, se secreta insulina tanto a tasa basal como a tasas incrementadas tras la estimulación de la glucosa, manteniendo la homeostasis metabólica mediante la conversión de la glucosa en glucógeno.

La expresión diabetes mellitus comprende varios estados hiperglucémicos diferentes. Entre estos estados se incluyen la diabetes de tipo I (diabetes mellitus insulino-dependiente, o IDDM) y la diabetes de tipo II (diabetes mellitus no insulino-dependiente, o NIDDM). La hiperglucemia presente en individuos con diabetes de tipo I se asocia a niveles deficientes, reducidos o nulos de insulina que resultan insuficientes para mantener los niveles sanguíneos de glucosa dentro del rango fisiológico. El tratamiento de la diabetes de tipo I implica la administración de dosis de sustitución de insulina, generalmente mediante una vía parenteral. La hiperglucemia presente en individuos con diabetes de tipo II se asocia inicialmente a niveles normales o elevados de insulina; sin embargo, estos individuos son incapaces de mantener la homeostasis metabólica debido a un estado de resistencia a la insulina en tejidos periféricos y en el hígado y, a medida que avanza la enfermedad, debido a un deterioro progresivo de las células β pancreáticas que son responsables de la secreción de la insulina. De esta manera, la terapia inicial de la diabetes de tipo II puede basarse en cambios de la dieta y del estilo de vida potenciados mediante terapia con agentes hipoglucémicos orales, tales como sulfonilureas. Sin embargo, con frecuencia resulta necesaria la terapia de insulina, especialmente en los últimos estadios de la enfermedad, en un intento de alcanzar cierto control de la hiperglucemia y de minimizar las complicaciones de la enfermedad.

La estructura y la biología de la amilina han sido revisadas anteriormente. Ver, por ejemplo, Young, *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* 4:282-290, 1997; Gaeta y Rink, *Med. Chem. Res.* 3:483-490, 1994, y Pittner *et al.*, *J. Cell. Biochem.* 55S:19-28, 1994). La amilina es una hormona peptídica de 37 aminoácidos. Ha sido aislada, purificada y caracterizada químicamente como el componente principal de los depósitos de amiloide en los islotes de páncreas de personas diabéticas de tipo II fallecidas (Cooper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8628-8632, 1987). La molécula de amilina presenta dos modificaciones postraduccionales importantes: el extremo C-terminal se encuentra amidado, es decir, el residuo 37 es tirosinamida, y las cisteínas en las posiciones 2 y 7 se encuentran reticuladas formando un bucle N-terminal intramolecular, resultando esenciales ambas para la actividad biológica completa (Cooper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7763-7766, 1988). La amilina es el objeto de la patente US nº 5.367.052, publicada el 22 de noviembre de 1994.

En la diabetes de tipo I y en la diabetes de tipo II de estadio tardío, se ha demostrado la deficiencia en amilina y se ha propuesto la sustitución combinada con insulina como un tratamiento preferido respecto a la insulina sola en todas las formas de diabetes insulino-dependiente. La utilización de amilina y de agonistas de la amilina para el tratamiento de la diabetes mellitus es el objeto de la patente US nº 5.175.145, publicada el 29 de diciembre de 1992. Las composiciones farmacéuticas que contienen amilina y amilina más insulina se describen en la patente US nº 5.124.314, publicada el 23 de junio de 1992.

Se ha informado de que un exceso de acción de la amilina imita características clave de los estadios más tempranos de la diabetes de tipo II y se ha propuesto el bloqueo de la amilina como nueva estrategia terapéutica. Se da a conocer en la patente US nº 5.266.561, publicada el 30 de noviembre de 1993, que la amilina causa una reducción en la incorporación tanto basal como estimulada por la insulina de glucosa marcada en glucógeno en el músculo esquelético. También se ha dado conocer que este último efecto es compartido por el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (ver también Leighton y Cooper, *Nature* 335:632-635, 1988). La amilina y el CGRP eran aproximadamente equipotentes, mostrando una actividad marcada a concentraciones de entre 1 y 10 nM. También se informa de que la amilina reduce la captación estimulada por insulina de la glucosa en el músculo esquelético y reduce el contenido de glucógeno (Young *et al.*, *Amer. J. Physiol.* 259:45746-1, 1990). Se da a conocer el tratamiento de la diabetes de tipo II y de la resistencia a la insulina con antagonistas de amilina.

La amilina se sintetiza principalmente en las células beta pancreáticas y se secreta en respuesta a estímulos de nutrientes, tales como glucosa y arginina. Los estudios con líneas tumorales de células beta clonadas (Moore *et al.*,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 179(1), 1991) y páncreas de rata perfundidos (Ogawa *et al.*, J. Clin. Invest. 85:973-976, 1990) han demostrado que pulsos cortos, de 10 a 20 minutos, de secretagogos de nutrientes, tales como glucosa y arginina, estimulan la liberación de la amilina, así como de la insulina. La proporción molar de amilina:insulina de las proteínas secretadas varía entre preparaciones de aproximadamente 0,01 a 0,4, aunque aparentemente no varía mucho con estímulos agudos en cualquier otra preparación. Sin embargo, durante la estimulación prolongada por niveles elevados de glucosa, la proporción amilina:insulina puede incrementarse progresivamente (Gedulin *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 180(1):782-789, 1991). De esta manera, la amilina y la insulina no se secretan siempre en una proporción constante.

Se ha descubierto y publicado que determinadas acciones de la amilina son similares a las acciones no metabólicas del CGRP y de la calcitonina; sin embargo, las acciones metabólicas de la amilina descubiertas durante investigaciones de esta proteína recientemente identificada aparentemente reflejan su papel biológico primario. Por lo menos algunas de estas acciones metabólicas son imitadas por el CGRP, aunque a dosis que son marcadamente vasodilatadoras (ver, por ejemplo, Leighton y Cooper, Nature 335:632-635, 1988; Molina *et al.*, Diabetes 39:260-265, 1990).

La primera acción descubierta de la amilina fue la reducción de la incorporación estimulada por insulina de la glucosa en glucógeno en el músculo esquelético de rata (Leighton y Cooper, Nature 335:632-635, 1988); el músculo, de esta manera, se convertía en "resistente a la insulina". Los estudios posteriores con el músculo sóleo de la rata *ex vivo* e *in vivo* han indicado que la amilina reduce la actividad de la glucógeno sintasa, estimula la conversión de la glucógeno fosforilasa de la forma b inactiva en la forma a activa, estimula la pérdida neta de glucógeno (en presencia o en ausencia de insulina), incrementa los niveles de glucosa-6-fosfato, y puede incrementar la producción de lactato (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional nº PCT/US92/00185, publicada el 23 de julio de 1992 (publicación de patente internacional WO 92/11863). La amilina aparentemente no afecta al transporte de glucosa *per se* (por ejemplo Pittner *et al.*, FEBS Letts. 365(1):98-100, 1995). Los estudios de relaciones de dosis-respuesta con amilina y con insulina demuestran que la amilina actúa como un antagonista no competitivo o funcional de la insulina en el músculo esquelético (Young *et al.*, Am. J. Physiol. 263(2):E274-E281, 1992). No hay datos que respalden la idea de que la amilina interfiere con la unión de la insulina a sus receptores, o la activación posterior de la tirosina quinasa del receptor de insulina (Follett *et al.*, Clinical Research 39(1):39A, 1991; Koopmans *et al.*, Diabetologia 34:218-224, 1991).

Se cree que la amilina actúa a través de receptores presentes en las membranas plasmáticas. Los estudios de la amilina y del CGRP y el efecto de antagonistas selectivos, han conducido a informes de que la amilina actúa mediante su propio receptor (Beaumont *et al.*, Br. J. Pharmacol. 115(5):713-715, 1995; Wang *et al.*, FEBS Letts. 219:195-198, 1991 b), en contraste con la conclusión de otros trabajadores de que la amilina podría actuar principalmente en los receptores de CGRP (por ejemplo Chantry *et al.*, Biochem. J. 277:139-143, 1991; Zhu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177(2):771-776, 1991). Los receptores de amilina y su utilización en métodos para el cribado y ensayo de compuestos agonistas y antagonistas de la amilina se describen en la patente US nº 5.264.372, publicada el 23 de noviembre de 1993.

Aunque la amilina presenta efectos marcadores sobre el metabolismo energético hepático *in vivo*, no existe un acuerdo general, no existe un consenso general sobre qué acciones de la amilina se observan en hepatocitos aislados o en el hígado perfundido. Los datos disponibles no respaldan la idea de que la amilina provoque la glucogenólisis hepática, es decir, no actúa como el glucagón (por ejemplo, Stephens *et al.*, Diabetes 40:395-400, 1991; Gomez-Foix *et al.*, Biochem. J. 276:607-610, 1991). Se ha sugerido que la amilina podría actuar en el hígado provocando la conversión del lactato en glucógeno, aumentando la cantidad de glucosa disponible para ser liberada por el glucagón. De esta manera, la amilina podría actuar como una pareja anabólica de la insulina en el hígado, en contraste con su acción catabólica en el músculo.

En los adipocitos, ocurre la acción contraria a la que tiene lugar en el músculo y la amilina no presenta acción detectable alguna en la absorción de la glucosa estimulada por la insulina, en la incorporación en los triglicéridos, en la producción de CO₂ (Cooper *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:7763-7766, 1988), la lipólisis estimulada por la adrenalina, o la inhibición de la hidrólisis por la insulina (Lupien y Young, "Diabetes Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental, vol. 6(1), página 1318 (febrero de 1993)). De esta manera, la amilina ejerce efectos específicos de tejido, con una acción directa en el músculo esquelético, efectos marcados indirectos (mediante el suministro del sustrato) y quizá directos en el hígado, mientras que los adipocitos aparentemente "no perciben" la presencia o ausencia de la amilina.

También se ha informado de que la amilina puede presentar efectos marcados sobre la secreción de la insulina. En los páncreas perfundidos (Silvestre *et al.*, Reg. Pept. 31:23-31, 1990) y en la rata intacta (Young *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol. 84:R1-R5, 1992), algunos experimentos indican que la amilina inhibe la secreción de la insulina. Sin embargo, otros investigadores no han podido detectar efectos de la amilina en células β aisladas, en islotes aislados o en el animal entero (ver Broderick *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 177:932-938, 1991 y referencias en el mismo).

También se ha demostrado que la amilina y los agonistas de la amilina suprimen la secreción del glucagón. Al controlar las influencias que, de otro modo, afectarían a la secreción del glucagón (glucosa plasmática, insulina y presión sanguínea), se informa de que la amilina suprimió la respuesta de glucagón a la arginina en ratas (Gedulin *et*

al., *Metabolism* 46:67-70, 1997). El análogo de la amilina llamado pramlintida se ha publicado que elimina la elevación posprandial de la concentración de glucagón en personas con diabetes de tipo I. Fineman *et al.*, *Diabetes* 40:30A, 1997). La pramlintida, y otros análogos agonistas de la amilina, se describen y reivindican en la patente US nº 5.686.411, publicada el 11 de noviembre de 1997. No se ha demostrado ningún efecto glucagonostático de la amilina en el páncreas perfundido aislado (Silvestre *et al.*, *Regul. Pept.* 31:23-31, 1990), indicando que la amilina podría ejercer su acción glucagonostática a través de un mecanismo extrapancreático. La observación de que la supresión de la secreción del glucagón no se producen con el análogo de amilina llamado pramlintida en seres humanos durante la hipoglucemia inducida por insulina (Nyholm *et al.*, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 81:1083-1089, 1996; Kolterman *et al.*, *Diabetologia* 39:492-499, 1996) apoya adicionalmente la idea de que este efecto no se produce directamente sobre las células α sino que podría encontrarse mediado centralmente.

La amilina y los agonistas de la amilina inhiben potentemente el vaciado gástrico en ratas (Young *et al.*, *Diabetologia* 38(6):642-648, 1995), perros (Brown *et al.*, *Diabetes* 43 (supl. 1):172A, 1994) y seres humanos (Macdonald *et al.*, *Diabetologia* 38 (supl. 1):A32 (resumen 118), 1995). Se ha publicado que el vaciado gástrico resulta acelerado en ratas BB diabéticas de tipo I deficientes en amilina (Young *et al.*, *Diabetologia, supra*; Nowak *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 123(1):110-6, 1994) y en ratas tratadas con el antagonista de la amilina, AC187 (Gedulin *et al.*, *Diabetologia* 38(supl. 1):A244, 1995). El efecto de la amilina en el vaciado gástrico aparentemente es fisiológico (funcional a concentraciones en las que circula normalmente).

Entre las acciones no metabólicas de la amilina se incluyen los efectos de vasodilatación que pueden encontrarse mediados por la interacción con receptores vasculares del CGRP. Los ensayos *in vivo* publicados sugieren que la amilina es por lo menos entre aproximadamente 100 y 1.000 veces menos potente que el CGRP como vasodilatador (Brain *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 183:2221, 1990; Wang *et al.*, *FEBS Letts.* 291:195-198, 1991).

Se ha informado de que la amilina inyectada en el cerebro o administrada periféricamente suprime la ingesta de alimento (por ejemplo Chance *et al.*, *Brain Res.* 539:352-354, 1991), una acción compartida con el CGRP y la calcitonina. No se conoce cuáles son las concentraciones efectivas en las células que median en esta acción. También se ha publicado que la amilina presenta efectos tanto en osteoclastos aislados, en los que causa la quiescencia celular, como *in vivo*, en donde se ha publicado que reduce el calcio plasmático hasta en 20% en ratas, conejos y seres humanos con enfermedad de Piaget (ver, por ejemplo, Zaidi *et al.*, *Trends in Endocrin. and Metab.* 4:255-259, 1993). A partir de los datos disponibles, la amilina aparentemente resulta entre 10 y 30 veces menos potente que la calcitonina humana para estas acciones. Resulta interesante que, tal como se ha publicado, la amilina aparentemente incrementa la producción de AMPc en osteoclastos, pero no incrementa el Ca^{2+} citosólico, mientras que la calcitonina provoca ambos efectos (Alam *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179(1):134-139, 1991). Se sugirió, aunque no se demostró, que la amilina podría actuar mediante un único tipo de receptor, mientras que la calcitonina podría actuar mediante dos receptores, uno de los cuales en común con la actividad de amilina.

También se ha descubierto que, inesperadamente en vista de sus propiedades renal vasodilatadora y otras descritas anteriormente, la amilina incrementa de manera pronunciada la actividad de la renina plasmática en ratas intactas al administrarse subcutáneamente de una manera que evita cualquiera alteración de la presión sanguínea. Este último punto resulta importante debido a que una presión sanguínea reducida es un fuerte estímulo para la liberación de renina. Los antagonistas de la amilina, tales como los antagonistas del receptor de la amilina, incluyendo los selectivos para receptores de amilina respecto a CGRP y/o calcitonina, pueden utilizarse para bloquear la elevación inducida por amilina de la actividad de la renina plasmática. La utilización de antagonistas de la amilina para tratar los trastornos relacionados con la renina se describe en la patente US nº 5.376.638, publicada el 27 de diciembre de 1994.

En seres humanos normales, se han publicado niveles de amilina en ayuno de entre 1 y 10 pM y niveles posprandiales o posglucosa de entre 5 y 20 pM (ver, por ejemplo, Koda *et al.*, *The Lancet* 339:1179-1180, 1992). En individuos obesos resistentes a la insulina, los niveles de amilina posteriores a la ingestión de alimentos pueden ser más altos, alcanzando hasta aproximadamente 50 pM. En comparación, los valores de la insulina en ayuno y posprandial son de entre 20 y 50 pM, y de entre 100 y 300 pM, respectivamente, en personas sanas, presentándose niveles quizá 3 a 4 veces más altos en personas resistentes a la insulina. En la diabetes de tipo I, en la que las células beta resultan destruidas, los niveles de amilina se encuentran al nivel de detección o por debajo y no se incrementan en respuesta a la glucosa (Koda *et al.*, *The Lancet* 339:1179-1180, 1992). En ratones y ratas normales, se han publicado niveles basales de amilina de entre 30 y 100 pM, mientras que se han medido valores de hasta 600 pM en determinadas cepas diabéticas resistentes a la insulina de roedores (por ejemplo Huang *et al.*, *Hypertension* 19:I-101-I-109, 1991).

En mamíferos, la calcitonina funciona en la regulación del recambio de la médula ósea y en el metabolismo del calcio. La calcitonina, cuya liberación es causada por el tiroides bajo niveles elevados de calcio sérico, produce acciones sobre el hueso y otros órganos que tienden a reducir los niveles séricos de calcio. La calcitonina inhibe la actividad de los osteoclastos y reduce la resorción ósea, reduciendo de esta manera los niveles séricos de calcio. La calcitonina también altera la excreción del calcio, fosfato y de electrolitos por parte del riñón, aunque no se ha publicado cuál es la relevancia fisiológica de ello. La calcitonina ha sido utilizada clínicamente para el tratamiento de trastornos del metabolismo del calcio y del dolor, y su relación con niveles incrementados de glucosa ha sido el objeto de diversas publicaciones. Ver, por ejemplo, Azria *et al.*, "Calcitonins: Physiological and Pharmacological Aspects", páginas 24 a 25 (Springer-Verlag, 1989). La utilización de las calcitoninas en el tratamiento de la diabetes mellitus ha

sido descrita en la patente US nº 5.321.008, publicada el 14 de junio de 1994, y en la patente US nº 5.508.260, publicada el 16 de abril de 1996.

Se ha afirmado que determinados compuestos informados como derivados de calcitonina reducen el nivel plasmático del calcio e influyen sobre el metabolismo óseo (patente US nº 4.758.550 de Cardinaux *et al.*).

El documento WO 93/10148, la patente US nº 5.625.032 y la patente US nº 5.580.953, se refieren a compuestos que inhiben la actividad de la amilina destinados al tratamiento de la diabetes o de la obesidad. El documento WO 95/07098 da a conocer agonistas de la amilina para retrasar el vaciado gástrico. El documento WO 93/14408 da a conocer un fragmento de la calcitonina de salmón y su capacidad para modular los efectos de la amilina sobre la glucogénesis. Pozvek *et al.* (Molecular Pharmacology, páginas 658 a 665, 1997) dan a conocer análogos de la calcitonina del salmón como agonistas o agonistas inversos del receptor de la calcitonina. Jonderko *et al.* (J. of Clinical Gastroenterology, páginas 22 a 28, 1990) se refieren a la utilización de antagonistas de la amilina para modular la actividad de la renina en el tratamiento de la hipertensión. La patente DE nº 3640042 se refiere a polipéptidos con actividad de calcitonina derivados principalmente de la calcitonina del salmón. El documento WO 89/09786 se refiere a derivados de péptidos calcitonina.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos compuestos que presentan actividad regulando los efectos metabólicos mediados por la amilina en los mamíferos. Resulta inesperado que estos compuestos inhiban determinados efectos de la amilina y que también actúen como agonistas de la amilina para otros efectos de la misma.

Entre otros factores, la presente invención se basa en los inesperados resultados en el contexto de la presente invención de que los compuestos de la presente invención muestran un perfil biológico mixto de antagonismo y agonismo de la amilina conjuntamente con una unión relativamente débil a los receptores del CGRP. En particular, se ha determinado que estos compuestos actúan como antagonistas de la amilina en el bloqueo de las respuestas relacionadas con el glucógeno asociadas a la acción de la amilina en el músculo y que también actúan como agonistas de la amilina en la inhibición del vaciado gástrico. Se cree que, debido a esta inesperada combinación de efectos biológicos, estos compuestos resultarán útiles en el tratamiento de la diabetes, indicando diabetes de tipo I, debido a sus efectos de inhibición del vaciado gástrico, y que también resultarán útiles en el tratamiento de la tolerancia alterada a la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, particularmente la diabetes de tipo II temprana, y el síndrome X, debido a sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa.

Además, debido a su acción sobre los niveles plasmáticos del calcio, los presentes compuestos podrían resultar particularmente ventajosos.

Los compuestos de la presente invención también resultan útiles para llevar a cabo estudios referentes a la caracterización de receptores, por ejemplo la caracterización de receptores a los que se unen las amilinas. Además, la presente invención resulta útil como compuestos de ensayo y muestras de control en los ensayos descritos en los ejemplos a continuación.

Según la presente invención, se proporcionan compuestos de fórmula:

X₁-X₂-X₃-Leu-X₄-Glu-Leu-X₅-X₆-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-X₇-Z₃ [SEC ID nº 27]

en la que:

- (a) X₁ es el grupo Z₁-Ser-Thr-Z₂-Val-Leu [SEC ID nº 28], en el que Z₁ es un grupo alcanoílo, y Z₂ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Ala, Ser, Cys y Thr,
- (b) X₂ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Gly, Glu, Asn o Aib,
- (c) X₃ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn, Lys y Lys ε-amidado con ácido acético,
- (d) X₄ es un grupo que presenta dos residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por Ser-Gln, Thr-Gln, Ala-Asn y Thr-Asn,
- (e) X₅ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por His, Aib, Ile, Leu y Val,
- (f) X₆ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn y Lys y derivados ε-amidados de los mismos,
- (g) X₇ es un grupo que presenta seis residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por:
 - (i) Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 29],
 - (ii) Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ [SEC ID nº 30],

(iii) Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 31],

(iv) Val-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ [SEC ID nº 32], y

(h) Z₃ es OH o NH₂,

con la condición de que el compuesto no presente la fórmula según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 20 ó 22 a 26,

y sus sales farmacéuticamente aceptables,

o un compuesto de fórmula:

- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 2], o
- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 10], o
- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 11],

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Definiciones

Según la presente invención, y según su uso en la presente memoria, se define que los términos siguientes presentan los significados siguientes, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

El término "amilina se entiende que incluye la hormona peptídica humana amilina secretada por las células beta del páncreas.

La expresión "agonista de amilina" también es una expresión conocida de la técnica, y se refiere a un compuesto que presenta actividades biológicas de amilina. Un agonista de amilina puede ser un compuesto peptídico o no peptídico. Este tipo de compuestos pueden actuar como agonistas de amilina, normalmente, según se cree en la actualidad, en virtud de la unión, o de otro modo mediante una interacción directa o indirecta, con un receptor de amilina u otro receptor o receptores con los que la amilina misma podría interactuar, induciendo una respuesta biológica.

La expresión "antagonista de amilina" se refiere a un compuesto que inhibe los efectos de la amilina. Un antagonista de amilina puede ser un compuesto peptídico o no peptídico.

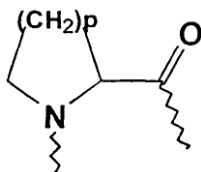
El término "alcanoílo" se refiere al grupo RC(=O)-, en el que R es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que puede derivarse a partir de un ácido carboxílico correspondiente.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales, a aminoácidos no naturales y a análogos de aminoácidos, todos ellos en sus formas estereoisoméricas D y L en el caso de que su estructura permita dichas formas estereoisoméricas. Entre los aminoácidos naturales se 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). Entre los aminoácidos no naturales se incluyen, aunque sin limitación, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico (Abu), ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico (Aib), ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpantilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina (Nva), norleucina (Nle), ornitina (Orn), pentilglicina, ácido pipercolico y tioprolina. Entre los análogos de aminoácidos se incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que se encuentran químicamente bloqueados, reversible o irreversiblemente, o modificados en su grupo amino N-terminal o en sus grupos de cadena lateral, tal como, por ejemplo, sulfóxido de metionina, sulfona de metionina, S-(carboximetil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína y sulfona de S-(carboximetil)-cisteína.

La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a un aminoácido en el que el grupo carboxi C-terminal, el grupo amino N-terminal o el grupo funcional de cadena lateral ha sido químicamente codificado en otro grupo funcional. Por ejemplo, beta-metil-éster de ácido aspártico es un análogo del aminoácido ácido aspártico, la N-etilglicina es un análogo del aminoácido glicina, o la carboxamida de alanina es un análogo del aminoácido alanina.

La expresión "residuo aminoácido" se refiere a radicales que presentan la estructura: (1) -C(O)-R-NH-, en la que R típicamente es -CH(R')-, en el que R' es una cadena lateral de aminoácidos, típicamente H o un sustituyente que

contiene carbono, o (2):



en el que p es 1, 2 ó 3, representando los residuos ácido azetidincarboxílico, prolina o ácido pipercolico, respectivamente.

5 El término "inferior" se refiere en la presente memoria, en el contexto de radicales orgánicos tales como grupos alquilo, como los grupos que incluyen hasta aproximadamente 6 inclusive, preferentemente hasta 4 inclusive, átomos de carbono, y ventajosamente uno o dos átomos de carbono. Dichos grupos pueden ser de cadena lineal o ramificada.

10 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales de los compuestos de la presente invención derivados de la combinación de dichos compuestos y un ácido orgánico o inorgánico. En la práctica, la utilización de la forma sal equivale a la utilización de la forma base. Los compuestos de la presente invención resultan útiles en forma tanto de base libre como de sal, considerándose que ambas formas se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Además, las abreviaturas siguientes representan lo siguiente:

15 "Ac" se refiere a acetilo.

"ACN" o "CH₃CN" se refiere a acetonitrilo.

"Boc", "tBoc" o "Tboc" se refiere a t-butoxi-carbonilo.

"DCC" se refiere a N,N'-diciclohexilcarbodiimida.

"Fmoc" se refiere a fluorenilmetoxycarbonilo.

20 "For" se refiere a formidato, por ejemplo "Lys(For)" se refiere a lisina formamidada.

"HBTU" se refiere a hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio.

"HOBt" se refiere a monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La figura 1 representa la estimulación acoplada a receptor de calcitonina de la adenil-ciclase por parte del compuesto del Ejemplo 1 ("Compuesto 1") [SEC ID n° 1]. Se midió la acumulación de AMPc en las células T47D como función de la concentración de compuesto de ensayo.

Las figuras 2A y 2B representan la actividad *in vitro* de antagonista de amilina del Compuesto 1 (figura 2A) y del compuesto del Ejemplo 2 ("Compuesto 2") [SEC ID n° 2] (figura 2B) en el ensayo de músculo sóleo.

30 La figura 3 representa una curva de respuesta a dosis para la actividad de antagonista de amilina del Compuesto 1 medida en el ensayo de músculo sóleo. Se muestra la reversión de los efectos de la amilina de rata sobre la incorporación estimulada por insulina de ¹⁴C-glucosa en músculo sóleo aislado bajo diversas dosis de compuesto de ensayo.

Las figuras 4A a 4C representan la actividad *in vivo* del Compuesto 1 sobre los niveles de glucosa plasmática (figura 4A), niveles de lactato plasmático (figura 4B) y niveles de calcio plasmático (figura 4C) en ratas anestesiadas.

35 Las figuras 5A a 5C representan la actividad *in vivo* del Compuesto 2 sobre los niveles de glucosa plasmática (figura 5A), niveles de lactato plasmático (figura 5B) y niveles de calcio plasmático (figura 5C) en ratas anestesiadas.

Las figuras 6A a 6C representan la actividad *in vivo* del Compuesto 1 y del Compuesto 2 en la inhibición de los efectos de la amilina de rata sobre los niveles plasmáticos de glucosa (figura 6A), de lactato (figura 6B) y de calcio (figura 6C) en ratas anestesiadas. También se midió la presión arterial media (figura 6D).

40 La figura 7 representa una curva de respuesta a dosis para los efectos *in vivo* del Compuesto 1 y del Compuesto 2 sobre la inhibición del vaciado gástrico en ratas.

La figura 8 representa las secuencias de aminoácidos de los Compuestos 1 a 13 [SEC ID n° 1 a 13].

La figura 9 representa las secuencias de aminoácidos de determinados compuestos peptídicos publicadas en la literatura [SEC ID nº 14 a 26]. Las referencias para las secuencias son las siguientes: SEC ID nº 14: 4 a 32, calcitonina de salmón; SEC ID nº 15: 8 a 32, calcitonina de salmón; SEC ID nº 16 y 17: patente US nº 5.580.953; SEC ID nº 18 y 19: Gamse *et al.*, J. Bone Min. Res. 8 (supl. 1):S200, resumen nº 334, 1993; y SEC ID nº 20 a 26: patente US nº 4.758.550.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Compuestos preferidos

Según la presente invención, se proporcionan los compuestos de fórmula:

X_1 - X_2 - X_3 -Leu- X_4 -Glu-Leu- X_5 - X_6 -Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn- X_7 - Z_3 [SEC ID nº 27]

en la que:

(a) X_1 es el grupo Z_1 -Ser-Thr- Z_2 -Val-Leu [SEC ID nº 28],

en la que Z_1 es un grupo alcanilo; y Z_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Ala, Ser, Cys y Thr;

(b) X_2 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Gly, Glu, Asn y Aib,

(c) X_3 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn, Lys y Lys ϵ -amidado con ácido acético,

(d) X_4 es un grupo que presenta dos residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por Ser-Gln, Thr-Gln, Ala-Asn y Thr-Asn,

(e) X_5 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por His, Aib, Ile, Leu y Val,

(f) X_6 es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn y Lys, y derivados ϵ -amidados de los mismos, y

(g) X_7 es un grupo que presenta 6 residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por:

(i) Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 29],

(ii) Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ [SEC ID nº 30],

(iii) Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 31],

(iv) Val-Gly-Ser-Gly-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 32], y

(h) Z_3 es OH o NH₂,

con la condición de que el compuesto no presente una fórmula según cualquiera de las secuencias SEC ID nº 20 ó 22 a 26. También se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, o un compuesto de fórmula:

- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 2], o

- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 10], o

- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 11],

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Preferentemente, entre los grupos X_1 se incluyen Z_1 -Ser-Thr- Z_2 -Val-Leu. Preferentemente Z_1 es un grupo alcanilo, proporcionando un derivado de amidación N-terminal de la serina con un ácido carboxílico, o Leu. Entre los ácidos carboxílicos adecuados se incluyen los ácidos carboxílicos de cadena lineal o ramificada de entre 1 y aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 átomos de carbono. Más preferentemente, Z_1 es un grupo alcanilo, proporcionando una amidación N-terminal. Entre los grupos Z_1 especialmente preferentes se incluyen 4-metilpentanoilo. Entre los grupos Z_1 preferidos se incluyen Ala o Cys, más preferentemente Ala.

Entre los grupos X_2 se incluyen Gly.

Entre los grupos X_3 preferidos se incluyen derivados ϵ -amidados con un ácido carboxílico que presente entre 1 y 8 átomos de carbono. Preferentemente, X_3 es Lys ϵ -amidado con ácido fórmico o acético. Entre los grupos X_3 especialmente preferidos se incluyen Lys(For).

5 Entre los grupos X_4 preferidos se incluyen Ser-Glu.

Entre los grupos X_5 preferidos se incluyen His o Aib. Más preferentemente, X_5 es Aib.

Entre los grupos X_6 preferidos se incluyen derivados ϵ -amidados que se amidan con un ácido carboxílico que presenta entre 1 y 8 átomos de carbono. Preferentemente, X_6 es Lys ϵ -amidada con ácido fórmico o acético. Entre los grupos X_6 especialmente preferidos se incluye Lys(For).

10 Entre los grupos X_7 preferidos se incluye Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 29] y Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ [SEC ID nº 30].

Preferentemente Z_3 es NH₂.

15 Según un aspecto especialmente preferido, se proporcionan compuestos en los que X_2 es Gly, X_5 es His o Aib, X_4 es Ser-Glu, X_7 es Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂ [SEC ID nº 29] o Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ [SEC ID nº 30], X_1 es Z_1 -Ser-Thr- Z_2 -Val-Leu, en el que preferentemente Z_1 es Leu o un grupo alcanoilo que proporciona la amidación N-terminal de la serina con un ácido carboxílico y Z_2 es Ala o Cys; X_3 y X_6 se ϵ -amidán con un ácido carboxílico. Para Z_1 , son preferidos los ácidos carboxílicos que presentan entre 1 y aproximadamente 10 átomos de carbono, más preferentemente entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8 átomos de carbono. Entre los ácidos carboxílicos especialmente preferidos se incluyen el ácido 4-metilpentanoico. Más preferentemente, Z_1 es un grupo alcanoilo que proporciona una amidación N-terminal. Más preferentemente, X_3 y X_6 son Lys amidadas con ácido fórmico o acético. Entre los grupos X_3 y X_6 especialmente preferidos se incluye Lys(For).

20 Entre los compuestos peptídicos preferidos de la presente invención se incluyen los que presentan secuencias de aminoácidos SEC ID nº 1 a 13 ("Compuestos 1 a 13", respectivamente). Entre los compuestos peptídicos especialmente preferidos se incluyen los Compuestos 1 y 2.

25 Actividad relacionada con amilina

Las actividades de los compuestos de la presente invención pueden confirmarse y cuantificarse mediante la realización de diversos ensayos de cribado, incluyendo los ensayos de unión de receptor descritos posteriormente en el Ejemplo A, el ensayo de estimulación de adenil-ciclasa descrito posteriormente en el Ejemplo B, el ensayo de músculo sóleo descrito a continuación en el Ejemplo C, la medición de la glucosa plasmática, los niveles de lactato y de calcio tal como se describe a continuación en los Ejemplos D y E, y el ensayo de vaciado gástrico descrito posteriormente en el Ejemplo F.

30 El ensayo de unión de receptor de núcleo accumbens, un ensayo de competición que mide la capacidad de los compuestos de unirse específicamente a receptores de amilina unidos a membrana, se describe en la patente US nº 5.264.372, publicada el 23 de noviembre de 1993, la exposición de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia. El ensayo de unión del receptor del núcleo accumbens también se describe en el Ejemplo A, posteriormente. Una fuente preferida de las preparaciones membranales utilizadas en el ensayo es el cerebro frontal basal que comprende membranas del núcleo accumbens y de las regiones circundantes. Los compuestos sometidos a ensayo compiten para la unión a estas preparaciones de receptor con amilina-¹²⁵I de rata Bolton-Hunter.

35 Se analizaron informáticamente curvas de competencia, en las que la cantidad unida (B) se representa en un gráfico como función del logaritmo de la concentración de ligando, utilizando análisis de regresión no lineal a una ecuación logística de 4 parámetros (programa Inplot; software GraphPAD, San Diego, California) o el programa ALLFIT de DeLean *et al.* (ALLFIT, versión 2.7 (NIH, Bethesda, MD 20892)). Munson y Rodbard, Anal. Biochem. 107:220-239, 1980).

40 El ensayo de unión de células SK-N-MC, que mide la capacidad de los compuestos de unirse específicamente a receptores de CGRP, se describe en el Ejemplo A, a continuación. La fuente preferida de las preparaciones membranales utilizadas en el ensayo eran células de neuroblastoma humano SK-N-MC, que se ha demostrado que contienen un receptor de CGRP de alta afinidad que se acopla a la adenil-ciclasa y que presenta características de unión y de especificidad similares a los receptores de CGRP presentes en varios otros tejidos (VanValen *et al.*, Neuroscience Letters 119:195-198, 1990).

45 El ensayo de unión de células T47D, que mide la capacidad de los compuestos de unirse específicamente a receptores de calcitonina, se describe en el Ejemplo A, a continuación. Se prepararon membranas a partir de cultivos celulares de carcinoma mamario T47D. La unión de los receptores de calcitonina se cuantificó mediante desplazamiento de la calcitonina de salmón marcada.

La actividad funcional de los compuestos en los receptores de calcitonina puede medirse de acuerdo con el

ensayo de la adenil-ciclasa descrito en el Ejemplo B, a continuación. Las células de carcinoma mamario humano T47D y MCF7 contienen receptores de calcitonina acoplados a la estimulación de la actividad de la adenil-ciclasa. En estas células, la calcitonina estimula un incremento de la acumulación del AMP cíclico.

Los ensayos de actividad biológica de compuestos en el músculo sóleo pueden llevarse a cabo utilizando métodos descritos anteriormente (Leighton B. y Cooper, Nature 335:632-635, 1988; Cooper *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7763-7766, 1988), en los que puede evaluarse la actividad agonista de amilina mediante la medición de la inhibición de la síntesis de glucógeno estimulada por la insulina. El ensayo del músculo sóleo también se describe en el Ejemplo C, posteriormente.

Los métodos para medir los efectos de los compuestos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, lactato y calcio se describen en los Ejemplos D y E.

Los métodos para medir la tasa de vaciado gástrico se dan a conocer en, por ejemplo, Young *et al.*, Diabetologia 38(6):642-648, 1995. En un método de rojo fenol, que se describe en el Ejemplo F, posteriormente, unas ratas conscientes recibieron mediante sonda gástrica un gel calórico que contenía metilcelulosa y un indicador rojo fenol. Veinte minutos después de introducir la sonda, los animales fueron anestesiados utilizando halotano, se expuso el estómago y se pinchó al nivel de los esfínteres pilórico y esofágico inferior, se extrajo y se abrió en una solución alcalina. El contenido del estómago puede derivarse de la intensidad del rojo fenol en la solución alcalina, medida a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En el método de la glucosa tritiada, se introducen sondas gástricas en ratas conscientes con glucosa tritiada en agua. Se sujetan suavemente las ratas por la cola, la punta de la cual se anestesia con lidocaína. Se recoge el tritio en el plasma separado de la sangre de la cola en diversos puntos del tiempo y se mide en un contador beta. Los compuestos de ensayo normalmente se administran aproximadamente un minuto antes de la introducción de la sonda.

Preferentemente, los compuestos de la presente invención muestran actividad en el ensayo de unión de receptores del núcleo accumbens del orden de menos de aproximadamente 1 a 5 nM, y más preferentemente de menos de aproximadamente 1 nM. En el ensayo del músculo sóleo, estos compuestos inhiben preferentemente los efectos de la amilina en el intervalo de concentraciones de 1 a 100 nM, y más preferentemente en el intervalo de entre 5 y 50 nM, y muestran valores de IC₅₀ del orden de menos de aproximadamente 1 a 2 µM. En los ensayos de vaciado gástrico, los compuestos preferentes muestran valores de ED₅₀ del orden de menos de 100 µg/rata, y más preferentemente de menos de 10 µg/rata.

Preparación de los compuestos

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida estándares y preferentemente un sintetizador de péptidos automatizado o semiautomatizado. Típicamente, mediante la utilización de dichas técnicas se acoplan un aminoácido protegido con α-N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento en una resina a temperatura ambiente en un solvente inerte, tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidina 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 elimina del péptido-resina resultante utilizando un reactivo, tal como ácido trifluoroacético o piperidina, y la reacción de acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido N-prottegido que debe añadirse a la cadena peptídica. Los grupos N-protectores adecuados son bien conocidos de la técnica, siendo preferidos en la presente memoria t-butiloxycarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Una resina preferida para la utilización con reacciones de Fmoc que entrega una amida C-terminal es la resina Rink amida MBHA (resina 4-(2',2'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-MBHA).

Los solventes, derivados aminoácidos y resina 4-metilbenzohidril-amina utilizados en el sintetizador de péptidos pueden obtenerse de Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). La resina Rink amida MBHA se encuentra disponible en Novabiochem (La Jolla, CA). Los aminoácidos protegidos de cadena lateral siguientes pueden obtenerse de Applied Biosystems, Inc.: Boc-Arg(Mts), Fmoc-Arg(Pmc), Boc-Thr(Bzl), Fmoc-Thr(t-Bu), Boc-Ser(Bzl), Fmoc-Ser(t-Bu), Boc-Tyr(BrZ), Fmoc-Tyr(t-Bu), Boc-Lys(Cl-Z), Fmoc-Lys(Boc), Boc-Glu(Bzl), Fmoc-Glu(t-Bu), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Asn(Trt) y Fmoc-Gln(Trt). Puede obtenerse Boc-His(BOM) de Applied Biosystems, Inc., o de Bachem Inc. (Torrance, CA). Puede obtenerse Fmoc-Lys (For) y Fmoc-Aib de Bachem, Inc. (Torrance, CA). Puede obtenerse anisol, anhídrido acético, ácido isocaproico, dimetilsulfuro, fenol, etanoditiol y tioanisol de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Air Products and Chemicals (Allentown, PA) suministra el HF. Puede obtenerse éter etílico, ácido acético y metanol de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo con un sintetizador de péptidos automático (modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando el sistema NMP/HOBt y reacciones de tBoc o Fmoc (ver el manual para el usuario de Applied Biosystems para el sintetizador de péptidos ABI 430A, versión 1.3B, 1 de julio de 1988, sección 6, páginas 49 a 70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con adición de caperuza. Las resinas-péptido-Boc pueden escindir-se con HF (-5°C a 0°C, 1 hora). El péptido puede extraerse de la resina con tratamientos alternantes de agua y ácido acético, y liofilizarse los filtrados. Las resinas-péptido-Fmoc pueden escindir-se según métodos estándares (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, páginas 6 a 12). Los péptidos también pueden construirse utilizando un sintetizador Advanced Chem Tech (modelo MPS 350, Louisville, Kentucky).

Los péptidos pueden purificarse mediante RP-HPLC (preparativa y analítica) utilizando un sistema Waters Delta Prep 3000. Puede utilizarse una columna preparativa C4, C8 ó C18 (10 μ , 2,2 x 25 cm, Vydac, Hesperia, CA) para aislar los péptidos, y la pureza puede determinarse utilizando una columna analítica C4, C8 ó C18 (5 μ , 0,46 x 25 cm, Vydac). Los solventes (A=TFA al 0,1%/agua y B=TFA al 0,1%/CH₃CN) pueden añadirse a la columna analítica a un caudal de 1,0 ml/minuto, y a la columna preparativa a un caudal de 15 ml/minuto. Los análisis de los aminoácidos pueden llevarse a cabo en el sistema Waters Pico Tag y procesarse utilizando el programa Maxima. Los péptidos pueden hidrolizarse mediante hidrólisis ácida en fase vapor (115°C, 20 a 24 horas). Los hidrolizados pueden derivarse y analizarse mediante métodos estándares (Cohen *et al.*, The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, páginas 11 a 52, Millipore Corporation, Milford, MA, 1989). Puede llevarse a cabo un análisis de bombardeo atómico rápido, en M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). La calibración de masa puede llevarse a cabo utilizando yoduro de cesio o yoduro de cesio/glicerol. El análisis de ionización por desorción de plasma con detección de tiempo de vuelo puede llevarse a cabo en un espectrómetro de masas Applied Biosystems Bio-Ion 20.

Los compuestos péptidos útiles en la invención también pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante, utilizando métodos actualmente conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor, 1989). Los compuestos no peptídicos útiles en la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos de en a técnica.

Los compuestos a los que se ha hecho referencia anteriormente pueden formarse sales con diversos ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Entre dichas sales se incluyen sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido succínico y ácido tartárico, y ácido canforsulfónico. Entre las sales preparadas con bases se incluyen sales amónicas, sales de metal alcalino, por ejemplo sales sódicas y potásicas, y sales de alcalino-térreos, por ejemplo sales de calcio y de magnesio. Resultan preferidas las sales acetato, hidrocloreto y trifluoroacetato. Las sales pueden formarse por medios convencionales, tal como mediante la reacción de las formas de ácido o base libre del producto con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiado en un solvente o medio en el que resulte insoluble la sal, o en un solvente tal como agua, que después se elimina al vacío o mediante secado por congelación o mediante intercambio de los iones de una sal existente por otro ion en una resina de intercambio iónico adecuada.

Formulación y administración

Las composiciones útiles en la invención pueden proporcionarse convenientemente en forma de formulaciones adecuadas para la administración parenteral (incluyendo intravenosa, intramuscular y subcutánea) o nasal u oral, o convenientemente encapsuladas, o preparadas de otra manera mediante métodos conocidos de la técnica para la administración oral. El formato de administración adecuado podrá ser determinado óptimamente por un médico para cada paciente de manera individual. Los portadores farmacéuticamente aceptables y su formulación se describen en tratados estándares de formulación, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, de E.W. Martin; ver también Wang, Y.J. y Hanson, M.A., "Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers", Journal of Parenteral Science and Technology, informe técnico nº 10, supl. 42:2S, 1988.

Los compuestos que resultan útiles en la invención pueden proporcionarse en forma de composiciones parenterales para la inyección o infusión, o pueden, por ejemplo, suspenderse en un aceite inerte, convenientemente un aceite vegetal, tal como aceite de sésamo, cacahuete, oliva u otro portador aceptable. Preferentemente se suspenden en un portador acuoso, por ejemplo en una solución tamponadora isotónica a un pH de entre aproximadamente 5,6 y 7,4. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales de esterilización, o pueden esterilizarse mediante filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según resulte necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tal como agentes tamponadores del pH. Entre los tampones útiles están comprendidos, por ejemplo, los tampones de acetato sódico/ácido acético. Puede utilizarse una forma de preparación de liberación lenta de reposición o "depósito" de manera que se administren cantidades terapéuticamente efectivas de la preparación en el flujo sanguíneo durante muchas horas o días tras la inyección o administración transdérmica.

Preferentemente, dichas formas de dosificación parenteral se preparan según la solicitud de patente en cotitularidad titulada "Parenteral, Liquid Formulations for Amylin Agonist Peptides", nº de serie 60/035.140, presentada el 8 de enero de 1997, e incluyen aproximadamente 0,01% a 0,5% (p/v), respectivamente, de un compuesto en un sistema acuoso conjuntamente con aproximadamente 0,02% a 0,5% (p/v) de un tampón acetato, fosfato, citrato o glutamato para obtener un pH de la composición final de aproximadamente 3,0 a 6,0 (más preferentemente de 3,0 a 5,5), así como aproximadamente 1,0 a 10% (p/v) de un carbohidrato o tonificador alcohol polihídrico en una fase continua acuosa. También se encuentra presente en la formulación preferida de producto concebida para permitir que el paciente extraiga múltiples dosis aproximadamente 0,005% a 1,0% (p/v) de un conservante antimicrobiano seleccionado de entre el grupo constituido por m-cresol, alcohol bencílico, metilparabén, etilparabén, propilparabén y butilparabén y fenol. Se utiliza una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración deseada de solución. También puede encontrarse presente cloruro sódico, así como otros excipientes, si se desea. Sin embargo, dichos excipientes deben mantener la estabilidad global del péptido. Más preferentemente, en la formulación para la administración parenteral, el alcohol polihídrico es manitol, el tampón es un tampón acetato, el conservante es m-cresol aproximadamente al 0,1% a 0,3% p/v, y el pH es de aproximadamente 3,7 a 4,3.

5 La isotonicidad deseada puede conseguirse utilizando cloruro sódico u otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol, polioles (tales como manitol y sorbitol) u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro sódico resulta preferido, particularmente para tampones que contienen iones sodio. Si se desea, las soluciones de las composiciones anteriormente indicadas pueden espesarse con un agente espesante, tal como metilcelulosa. Pueden prepararse en forma emulsionada, en forma de agua en aceite o de aceite en agua. Puede utilizarse cualquiera de entre una amplia diversidad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, acacia en polvo, un surfactante no iónico (tal como Tween), o un surfactante iónico (tal como sulfatos o sulfonatos de alcohol poliéter alcalino, por ejemplo un Triton).

10 Las composiciones que resultan útiles en la invención se preparan mediante la mezcla de los ingredientes siguiendo procedimientos aceptados de manera general. Por ejemplo, los componentes seleccionados pueden mezclarse simplemente en un mezclador u otro dispositivo estándar para producir una mezcla concentrada que después puede ajustarse a la concentración y viscosidad finales mediante la adición de agua o agente espesante y posiblemente un tampón para controlar el pH, o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

15 Para la utilización por el médico, las composiciones se proporcionan en forma de dosificación unitaria que contiene una cantidad de un compuesto de la presente invención, por ejemplo un compuesto que resulte efectivo en una o múltiples dosis para proporcionar un efecto terapéutico al nivel seleccionado.

20 Las cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la presente invención para la utilización en el control de la hiperglucemia, incluyendo la hiperglucemia asociada a la resistencia a la insulina, son aquéllas que reducen significativamente los niveles posprandiales de glucosa con respecto al control, según medición mediante la comparación del área bajo la curva de las concentraciones posprandiales de glucosa. Tal como apreciarán los expertos en la materia, una cantidad efectiva del agente terapéutico variará con muchos factores, incluyendo la edad y peso del paciente, el estado físico del paciente, la acción que debe obtenerse y otros factores.

25 Las dosis individuales, divididas o continuas efectivas de los compuestos típicamente se encuentran comprendidas en el intervalo de 1 µg/kg/día y aproximadamente 100 µg/kg/día, preferentemente entre aproximadamente 0,1 µg/kg/día y aproximadamente 10 µg/kg/día, administrados en una única dosis o en múltiples dosis.

30 Tal como apreciará el experto en la materia, una cantidad efectiva de agente terapéutico variará con muchos factores, incluyendo la edad y peso del paciente, el estado físico del paciente y otros factores. Los compuestos activos oralmente pueden administrarse oralmente, sin embargo las dosis deberían incrementarse 5 a 10 veces, o deberían incrementarse (o reducirse) en la proporción indicada anteriormente.

35 Para ayudar a la comprensión de la presente invención, se incluyen los ejemplos siguientes, que describen los resultados de varios experimentos. Los experimentos relativos a la presente invención no deben interpretarse, evidentemente, como específicamente limitativos de la invención y dichas variaciones de la invención, conocidas en la actualidad o desarrolladas posteriormente, que se encontrarían comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, se considera que se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención tal como se describe en la presente memoria y reivindicada a continuación en la presente memoria.

EJEMPLO 1

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 1

El Compuesto 1, que presenta la fórmula siguiente:

40 Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-Glu-
Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-
Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 1]

45 se preparó en resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-norleucina MBHA (Novabiochem, 0,44 mmoles/g) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.). Se utilizaron ciclos de acoplamiento único durante toda la síntesis y se utilizaron reacciones Fast-Moc (activación de HBTU). La resina con péptidos completa se desprotegió y se liberaron los péptidos utilizando una mezcla de trietilsilano (0,2 ml), etanodiol (0,2 ml), anisol (0,2 ml), agua (0,2 ml) y ácido trifluoroacético (15 ml) según métodos estándares (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc.). Se precipitaron los péptidos en éter/agua (50 ml) y se centrifugaron. El precipitado se reconstituyó en GAA y se liofilizó. Los péptidos liofilizados se disolvieron en agua. La pureza cruda era de aproximadamente 55%.

50 En las etapas de purificación se utilizaron Solvente A (TFA al 0,1% en agua) y Solvente B (TFA al 0,1% en ACN).

La solución que contenía péptidos se aplicó a una columna C-18 preparativa y se purificó (Solvente B al 10% a 40% en Solvente A durante 40 minutos). El péptido presentaba un tiempo de retención observado de 31 minutos. Se

determinó la pureza de las fracciones isocráticamente utilizando una columna analítica C-18. Se agruparon las fracciones puras, proporcionando el péptido identificado anteriormente. El rendimiento fue de 84,2 mg (10,2% del nivel teórico). La RP-HPLC analítica (gradiente de 20% a 50% de Solvente B en Solvente A durante 20 minutos) del péptido liofilizado proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 17,5 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.308,7; observado, 3.308,0.

EJEMPLO 2

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 2

El Compuesto 2, que presenta la fórmula siguiente:

4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-
Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-
Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 2]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, con la excepción de que se incorporó el grupo isocaproilo N-terminal utilizando ácido isocaproico en el ciclo final de la síntesis. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-18 (Solvente B al 25% a 45% en Solvente A durante 40 minutos). El péptido presentaba un tiempo de retención observado de 22 minutos. La RP-HPLC analítica (Solvente B al 30% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó el producto péptido con un tiempo de retención de 18,7 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización [M+H]⁺: calculado, 3.114,7; observado: 3.114,7.

EJEMPLO 3

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 3

El Compuesto 3, que presenta la fórmula siguiente:

Ac-Leu-Ser-Thr-Ser-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu
His-Arg-leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-
Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 3]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. La acetilación se realizó utilizando anhídrido acético. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-18 Supelco LC-18OB (21 x 250 mm) con un caudal de 200 ml/minuto (Solvente B al 25% a 45% en Solvente A durante 20 minutos), proporcionando un péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 17 minutos. La RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó producto péptido con un tiempo de retención de 16,7 minutos. Espectrometría de masas FAB [M+H]⁺: calculado, 3.277,6; observado: 3.278,3.

EJEMPLO 4

PREPARACIÓN DE COMPUESTO 4

El Compuesto 4, que presenta la fórmula siguiente:

Leu-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-Glu-
Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-
Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 4]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-18 tal como la indicada en el Ejemplo 3, y eluyendo con un gradiente (Solvente B al 25% a 45% en Solvente A durante 20 minutos), proporcionando péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 13 minutos. Una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 15,05 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.276,7; observado, 3.277,8.

EJEMPLO 5**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 5**

El Compuesto 5, que presenta la fórmula:

Leu-Ser-Thr-Ser-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-Glu-

Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-

Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 5]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-18 tal como la descrita en el Ejemplo 3, y eluyendo con un gradiente (Solvente B al 25% a 45% en Solvente A durante 20 minutos), proporcionando péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 14 minutos. Una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 15,5 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.292,7; observado, 3.293,9.

EJEMPLO 6**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 6**

El Compuesto 6, que presenta la fórmula siguiente.

Ac-Leu-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-

Glu-Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-

Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 6]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se realizó la acetilación utilizando anhídrido acético. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-18 tal como se describe en el Ejemplo 1, eluyendo con un gradiente (Solvente B al 25% a 45% en Solvente A durante 20 minutos), proporcionando un péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 17 minutos. Una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 16,91 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.261,6; observado, 3.262,5.

EJEMPLO 7**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 7**

El Compuesto 7, que presenta la fórmula siguiente:

Ac-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-

Glu-Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-

Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 7]

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se realizó la acetilación en anhídrido acético. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-8 tal como se describe en el Ejemplo 1, eluyendo con un gradiente (Solvente B al 15% a 30% en Solvente A durante 40 minutos), proporcionando un péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 32 minutos. Una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 16,83 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.350,8; observado, 3.349,5.

EJEMPLO 8**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 8**

El Compuesto 8, que presenta la fórmula siguiente:

Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Gl-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-

Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 8]

5 se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-8 tal como se describe en el Ejemplo 1, eluyendo con un gradiente (Solvente B al 25% a 50% en Solvente A durante 40 minutos), proporcionando un péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 12 minutos. Una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 40% en Solvente A durante 20 minutos) proporcionó un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 19,17 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 2.879,5; observado, 2.879,4.

EJEMPLO 9

10

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 9

El Compuesto 9, que presenta la fórmula siguiente:

Ac-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-

Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 9]

15

20

se preparó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1. Se realizó la acetilación utilizando anhídrido acético. Se llevó a cabo una RP-HPLC preparativa utilizando una columna C-8 tal como se describe en el Ejemplo 1, eluyendo con un gradiente (Solvente B al 25% a 50% en Solvente A durante 40 minutos), proporcionando un péptido que presentaba un tiempo de retención observado de 13 minutos. Se llevó a cabo una RP-HPLC analítica (Solvente B al 20% a 50% en Solvente A), proporcionando un producto péptido que presentaba un tiempo de retención de 14,24 minutos. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 2.921,5; observado, 2.921,1.

EJEMPLO 10

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 10

El Compuesto 10, que presenta la fórmula siguiente:

25

4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-

Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-

Tyr [SEC ID nº 10]

30

35

se construyó en una resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) utilizando aminoácidos protegidos con FMOC (Applied Biosystems, Inc.), se escindieron de la resina, se desprotegeron y se purificaron de una manera similar a la del Ejemplo 1, con la excepción de que se incorporó el grupo 4-metilpentanoilo N-terminal utilizando ácido 4-metilpentanoico en el ciclo de síntesis final. En el análisis se utilizó Solvente A (TFA al 0,1% en agua) y Solvente B (TFA al 0,1% en ACN). A continuación, se llevó a cabo una RP-HPLC analítica (gradiente de Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado para determinar el tiempo de retención del producto péptido. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.237,43.

EJEMPLO 11

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 11

40

El Compuesto 11, que presenta la fórmula siguiente:

4-metilpentanoil-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-

Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-

Tyr [SEC ID nº 11]

se construyó en resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindieron de la resina, se desprotegieron y se purificaron de una manera similar a la del Ejemplo 1, excepto en que se incorporó el grupo 4-metilpentanoil N-terminal utilizando ácido 4-metilpentanoico en el ciclo final de la síntesis. En el análisis se utilizó Solvente A (TFA al 0,1% en agua) y Solvente B (TFA al 0,1% en ACN). A continuación, se llevó a cabo una RP-HPLC analítica (gradiente de Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado para determinar el tiempo de retención del producto péptido. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 3.269,49.

EJEMPLO 12

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 12

El Compuesto 12, que presenta la fórmula siguiente:

Ala-Thr-Aib-Lys(For)-Leu-Ala-Asn-Glu-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-

Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 12]

se construyó en resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindieron de la resina, se desprotegieron y se purificaron de una manera similar a la del Ejemplo 1. En el análisis se utilizó Solvente A (TFA al 0,1% en agua) y Solvente B (TFA al 0,1% en ACN). A continuación, se llevó a cabo una RP-HPLC analítica (gradiente de Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado para determinar el tiempo de retención del producto péptido. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 2.809,89.

EJEMPLO 13

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 13

El Compuesto 13, que presenta la fórmula siguiente:

Ac-Ala-Thr-Aib-Lys(For)-Leu-Ala-Asn-Glu-Leu-Aib-

Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-

Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 13]

se construyó en resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxiacetamido-norleucil-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) utilizando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindieron de la resina, se desprotegieron y se purificaron de una manera similar a la del Ejemplo 1. La acetilación se realizó utilizando anhídrido acético. En el análisis se utilizó Solvente A (TFA al 0,1% en agua) y Solvente B (TFA al 0,1% en ACN). A continuación, se llevó a cabo una RP-HPLC analítica (gradiente de Solvente B al 20% a 50% en Solvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado para determinar el tiempo de retención del producto péptido. Espectrometría de masas con electropulverización (M): calculado, 2.851,92.

EJEMPLO A

ENSAYOS DE UNIÓN DE RECEPTORES

Se llevaron a cabo ensayos de unión de receptores utilizando péptidos yodados radioactivamente y membranas procedentes de células o tejidos que contenían densidades relativamente altas del receptor que debía medirse.

La unión de los compuestos de ensayo a los receptores de amilina se midió a partir de la unión de amilina de rata-¹²⁵I-BH (marcaje ¹²⁵I-Bolton-Hunter en la lisina N-terminal) a membranas del núcleo accumbens de rata, tal como se indica posteriormente.

La unión de los compuestos de ensayo a los receptores de CGRP se midió a partir de la unión de ¹²⁵I-L-αCGRP (marcado con ¹²⁵I en la histidina) a membranas de células de neuroblastoma SK-N-MC humano.

La unión de los compuestos de ensayo a los receptores de calcitonina se midió a partir de la unión de

calcitonina humana-¹²⁵I (marcada con ¹²⁵I en la tirosina) a membranas procedentes de células del carcinoma mamario MCF7 humano, que expresa densidades elevadas de receptores de calcitonina acoplados a adenilil-ciclasa. En estos experimentos se utilizó una sublínea clonal (MCF-7) que se aisló a partir de la línea celular parental MCF7.

Unión a membranas de núcleo accumbens de rata (receptores de amilina).

La evaluación de la unión de compuestos a los receptores de amilina se llevó a cabo de la manera siguiente. Se obtuvo amilina de rata-¹²⁵I-BH de Amersham Corporation (Arlington Heights, IL). Las actividades específicas en el momento de la utilización se encontraban comprendidas entre 1.950 y 2.000 Ci/mmol. Se obtuvieron péptidos no marcados de BACHEM Inc. (Torrance, CA) y de Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

Se sacrificaron ratas Sprague-Dawley macho (de 200 a 250 gramos) mediante decapitación. Se extrajeron los cerebros y se introdujeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se realizaron cortes desde la superficie ventral hasta rostralmente respecto al hipotálamo, limitados lateralmente por los tractos olfativos y que se extendían en un ángulo de 45° medialmente respecto a dichos tractos. Este tejido del cerebro frontal basal, que contiene el núcleo accumbens y regiones circundantes, se pesó y se homogeneizó en tampón HEPES 20 mM helado (ácido HEPES 20 mM, pH ajustado a 7,4 con NaOH a 23°C). Las membranas se lavaron tres veces en tampón fresco mediante centrifugación durante 15 minutos a 48.000xg. El sedimento de membranas final se resuspendió en tampón HEPES 20 mM que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM.

Para medir la unión de la amilina-¹²⁵I, se incubaron membranas procedentes de 4 mg de peso húmedo original de tejido con amilina-¹²⁵I a una concentración de entre 12 y 16 pM en tampón HEPES 20 mM que contenía 0,5 mg/ml de bacitracina, 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino y PMSF 0,2 mM. Las soluciones se incubaron durante 60 minutos a 23°C. Se finalizaron las incubaciones mediante filtración a través de filtros de fibra de vidrio GF/B (Whatman Inc., Clifton, NJ) que habían sido presumergidos durante 4 horas en polietilenimina al 0,3% con el fin de reducir la unión no específica de los péptidos marcados radioactivamente. Los filtros se lavaron inmediatamente antes de la filtración con 5 ml de PBS frío, e inmediatamente después de la filtración con 15 ml de PBS frío. Se extrajeron los filtros y se evaluó la radioactividad en un contador gamma a una eficiencia de recuento del 77%.

Unión a membranas de células SK-N-MC (receptores de CGRP)

Se homogeneizaron células SK-N-MC (ATCC nº HTB-10) en tampón Hepes 50 mM, pH 7,4, y las membranas se recogieron mediante centrifugación durante 15 minutos a 48.000 x g. Las membranas se suspendieron a una concentración de entre 0,1 y 0,2 mg de proteína/0,2 ml de alícuota en Hepes 50 mM, pH 7,4, que contenía albúmina de suero bovino, bacitracina y MgCl₂ 2 mM con CGRP humano-¹²⁵I] 15 pM (marcado en His¹⁰, 2.000 Ci/mmol) y péptidos no marcados. Los métodos adicionales fueron similares a los descritos para los ensayos de receptores de amilina. Se derivó K_i como IC₅₀/(1+([L]/K_d)), en la que [L] era 15 pM y K_d era 3 pM.

Se ha demostrado que las células de neuroblastoma humano SK-N-MC contienen un receptor de CGRP de alta afinidad que se acopla a la adenilato-ciclasa y que presenta características de unión y especificidad similares a los receptores de CGRP presentes en varios otros tejidos (VanValen *et al.*, 1990). Se derivaron los valores de K_i de la inhibición de la unión de CGRP¹²⁵I] a membranas procedentes de células SK-N-MC.

Unión a membranas de células T47D (receptores de calcitonina)

Se obtuvieron membranas de células del carcinoma mamario T47D humano (ATCC nº HTB 133), que se ha demostrado anteriormente que contienen densidades elevadas de receptores de calcitonina (Findlay *et al.*, 1980). Las membranas se prepararon a partir de cultivos confluentes de células T47D, tal como se ha indicado para las células SK-N-MC. Las membranas se incubaron con calcitonina de salmón-¹²⁵I] 32 pM (marcada en Tyr³², 2.000 Ci/mmol) y con péptidos no marcados durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los métodos adicionales son similares a los descritos para los ensayos de receptores de CGRP. Se derivó K_i como IC₅₀/(1+([L]/K_d)), en donde [L] era 32 pM y K_d era 19 pM.

Se cuantificó la unión a receptores de calcitonina mediante desplazamiento de la calcitonina de salmón-¹²⁵I] de las membranas en células de carcinoma T47D humano.

Resultados

Se sometieron a ensayo determinados compuestos de la presente invención en ensayos de unión de ligando radioactivo tal como se ha descrito anteriormente, para determinar sus afinidades para los receptores de amilina, calcitonina y CGRP.

Se generaron curvas de competición mediante la medición de la unión de ligandos radioactivos en presencia de concentraciones crecientes de compuestos de ensayo, determinando la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) con un programa iterativo de ajuste de curvas (regresión no lineal utilizando una ecuación logística de 4 parámetros; programa Inplot; software Graph PAD, San Diego).

TABLA I

Competición para los receptores de amilina, calcitonina y CGRP

Compuesto nº	Receptor IC ₅₀ en nM [media ± SEM (n)]		
	<u>Amilina</u>	<u>Calcitonina</u>	<u>CGRP</u>
1	0,250±0,091(4)	0,22±0,02(3)	160±42(4)
2	12,0±1,3(3)	0,37±0,03(3)	>10.000(1)
3	37,0±4,6(2)	1,45±0,04(2)	>10.000(2)
4	0,066±0,008(3)	0,13±0,07(2)	92±13(2)
5	0,092±0,011(2)	0,15±0,05(2)	44±12(2)
6	18,6±5,3(4)	0,56±0,02(2)	>10.000(2)
7	0,16±0,11(2)	0,21±0,07(2)	1.400(1)
8	23,6(1)	93(1)	>10.000(1)
9	7,6(1)	24(1)	>10.000(1)

Todos los compuestos de ensayo demostraron afinidades relativas para los receptores de amilina (núcleo accumbens) y de calcitonina (T47D), en comparación con sus afinidades para los receptores de CGRP (SK-N-MC). Por ejemplo, los compuestos de ensayo mostraron una afinidad por lo menos 300 veces inferior para los receptores de CGRP que para los receptores de amilina. Dentro de la serie de compuestos, los compuestos 1, 4, 5, 7, 8 y 9 mostraron potencias similares de los receptores de amilina y de calcitonina. Los compuestos 2, 3 y 6 mostraron una mayor afinidad para los receptores de calcitonina que para los receptores de amilina.

EJEMPLO B**ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE LA ADENIL-CICLASA**

Se sometieron a ensayo los compuestos de la presente invención para la actividad funcional en los receptores de calcitonina utilizando células de carcinoma mamario humano T47D (ATCC nº HTB 133) y MCF7 (ATCC nº 22), conteniendo ambos receptores de calcitonina acoplados a la estimulación de la actividad de la adenil-ciclasa. Para el Compuesto 1, también se determinó la actividad funcional en los receptores C1a de la calcitonina de rata en células HEK293 (ATCC nº CRL 1573) que había sido transfectada establemente con el receptor C1a de calcitonina de rata.

Se cultivaron las células hasta la confluencia en placas de 96 pocillos. Se extrajo el medio (mediante agitación sobre un sumidero y golpeando suavemente sobre celulosa). Se substituyó el medio por 100 µl de dPBS (10 ml de 10X PBS de Dulbecco diluido hasta 100 ml con agua; y 0,1 g de BSA libre de FA y 0,1 g de glucosa; pH ajustado a 7,4) que contenía BSA al 0,1% y glucosa al 0,1%. Las células se incubaron en un incubador de aire durante 20 a 30 minutos a 37°C. Se substituyó el medio por dPBS fresco que contenía IBMX 0,5 mM (se añadieron 4,5 mg de IBMX a 50 ml de dPBS modificado; la mezcla se sonizó hasta encontrarse el IBMX en solución). Las células se incubaron durante 10 minutos. Se diluyeron hormona y/o compuesto de ensayo en medio dPBS que contenía IBMX. Se añadieron a las placas una alícuota de 100 µl de solución de hormona (o de compuesto de ensayo). Las células se incubaron durante 20 a 30 minutos a 37°C en un incubador de aire humidificado. La reacción se detuvo mediante la adición de 20 µl de TCA al 5%. Las placas que contenían células se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos. Se añadió una alícuota de 20 µl de Trizma 0,8 M para neutralizar el medio. Las placas se agitaron, después se centrifugaron a 2.000 rpm en una centrífuga de suelo. Se decantó el sobrenadante y se utilizó directamente en tampón acetato en un radioinmunoensayo estándar de AMPc.

En las células de carcinoma mamario, la calcitonina humana estimuló un incremento de la acumulación del AMP cíclico con una EC₅₀ de 0,45 nM (MCF7-7) y de 3,1 nM (T47D). La amilina humana era 5 veces (MCF7-7) a 7 veces (T47D) menos potente que la calcitonina en la estimulación de la actividad de la adenil-ciclasa en estas células. La figura 1 representa el efecto del Compuesto 1 sobre la producción del AMP cíclico en las células T47D. El Compuesto 1 estimuló fuertemente la acumulación de AMP cíclico en las células T47D, con una EC₅₀ de 2,2 nM, tal como se representa en la fig. 1. En estas células, el Compuesto 1 era algo más potente que la calcitonina humana en la estimulación de la actividad de la adenil-ciclasa. De esta manera, el Compuesto 1 es un agonista funcional en los

receptores de calcitonina en células humanas. También se sometió a ensayo el Compuesto 1 en células que expresaban receptores C1a de calcitonina de rata, y nuevamente se observó que estimulaba fuertemente la actividad de la adenilil-ciclasa, con una $EC_{50}=0,97$ nM (datos no mostrados).

También se sometió a ensayo el Compuesto 2 para la actividad funcional en los receptores de calcitonina. El Compuesto 2 presentó una actividad agonista parcial en las células MCF7-7, produciendo un incremento del AMP cíclico que era aproximadamente 20% del incremento de producción producido por la calcitonina humana. El Compuesto 2 presentaba una EC_{50} de 1,6 nM (3,5 veces menos potente que la calcitonina humana) en la producción de este efecto.

También se sometieron a ensayo el Compuesto 4 ($EC_{50}=3,5$ nM) y el Compuesto 6 ($EC_{50}=34$ nM) en dicho ensayo y se observó que estimulaban la actividad de la adenilil-ciclasa en células MCF7-7, con una potencia 7 veces y 80 veces inferior que la calcitonina humana.

EJEMPLO C

ENSAYO DEL MÚSCULO SÓLEO

Se llevó a cabo la determinación de la actividad antagonista de amilina que presentaban los compuestos de ensayo en ensayos de músculo sóleo, de la manera siguiente. Se utilizaron ratas Harlan Sprague-Dawley macho de aproximadamente 200 g de masa con el fin de obtener una masa de músculo sóleo dividido inferior a 40 mg. Los animales fueron sometidos a ayuno durante 4 horas antes del sacrificio mediante decapitación. Se retiró la piel de la extremidad inferior, que después se clavó en una tabla de corcho. Se cortó el tendón de Aquiles en la parte inmediatamente superior del hueso calcáneo y se extrajo el *m. gastrocnemius* respecto al aspecto posterior de la tibia. Se expuso a continuación totalmente el *M. soleus*, un músculo plano de 15 a 20 mm de longitud y 0,5 mm de grosor sobre la superficie ósea de *m. gastrocnemius*, y se limpió el perimio utilizando tijeras pequeñas y pinzas. A continuación, se dividió el *M. soleus* en partes iguales utilizando un bisturí que se pasó anteroposteriormente a través del vientre del músculo para obtener un total de 4 tiras musculares de cada animal. Tras diseccionar el músculo del animal, se mantuvo durante un periodo corto en solución salina fisiológica. No resultó necesario mantener en tensión el músculo debido a que esta operación no presentaba efectos demostrables sobre la incorporación de glucosa radioactiva en glucógeno.

Se introdujo músculo en matraces Erlenmeyer de 50 ml que contenían 10 ml de tampón bicarbonato de Krebs-Ringer pregasificado que contenía (cada litro) NaCl 118,5 mmoles (6,93 g), KCl 5,94 mmoles (443 mg), $CaCl_2$ 2,54 mmoles (282 mg), $MgSO_4$ 1,19 mmoles (143 mg), KH_2PO_4 1,19 mmoles (162 mg), $NaHCO_3$ 25 mmoles (2,1 g), 5,5 mmoles de glucosa (1 g) e insulina humana recombinante (Humulin-R, Eli Lilly, IN) y el compuesto de ensayo, tal como se detalla a continuación. Se verificó que el pH a 37°C era de entre 7,1 y 7,4. Se asignaron músculos a los diferentes matraces de manera que se distribuyesen uniformemente 4 trozos de músculo de cada animal entre las diferentes condiciones de ensayo. Se gasificaron los medios de incubación mediante soplado suave de carbógeno (95% de O_2 , 5% de CO_2) sobre la superficie bajo agitación simultánea a 37°C en un baño de agua oscilante. Tras un periodo de "preincubación" de media hora, se añadieron 0,5 μ Ci de $U-^{14}C$ -glucosa a cada matraz, que se incubó durante 60 minutos adicionales. A continuación, se extrajo cada trozo de músculo rápidamente, se secó en un filtro y se congeló en N_2 líquido, se pesó y se almacenó para la determinación posterior de ^{14}C -glucógeno.

La determinación del ^{14}C -glucógeno se llevó a cabo en un vial de centelleo de 7 ml. Se introdujo cada espécimen de músculo congelado en un vial y se dirigió en 1 ml de hidróxido potásico al 60% a 70°C durante 45 minutos bajo agitación continua. Se precipitó el glucógeno disuelto en el vial mediante la adición de 3 ml de etanol absoluto y enfriamiento durante la noche a -20°C. Se aspiró suavemente el sobrenadante, se lavó nuevamente el glucógeno con etanol, se aspiró y el precipitado se secó bajo vacío. Se evaporó todo el etanol para evitar la extinción durante el recuento de centelleo. El glucógeno restante se disolvió nuevamente en 1 ml de agua y 4 ml de líquido de centelleo y se realizó un recuento del ^{14}C .

Se obtuvo la tasa de incorporación de glucosa en glucógeno (expresado en μ moles/g/h) a partir de la actividad específica de la glucosa- ^{14}C en la glucosa 5,5 mM del medio de incubación, y el recuento total de ^{14}C restante en el glucógeno extraído de cada músculo. Se ajustaron las curvas de dosis/respuesta a un modelo logístico de 4 parámetros utilizando una rutina iterativa de cuadrados mínimos (ALLFIT, v2.7, NIH, MD) para derivar las EC_{50} . Debido a que la EC_{50} presenta una distribución log-normal, se expresa $\pm$ error estándar del logaritmo. Se llevaron a cabo comparaciones apareadas utilizando rutinas basadas en la prueba t de SYSTAT (Wilkinson, "SYSTAT: the system for statistics", SYSTAT Inc., Evanston, IL, 1989).

Se generaron curvas de respuesta a dosis con músculos añadidos a un medio que contenía insulina 7,1 nM (1.000 μ U/ml) y se añadió cada compuesto de ensayo a concentraciones finales (nominales) de 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1.000 nM. Cada ensayo también contenía controles positivos internos que constaban de un único lote de amilina de rata archivada, se liofilizó y se almacenó a -70°C.

Las mediciones de la EC_{50} de las preparaciones de amilina en el ensayo de músculo sóleo se encuentran comprendidas típicamente entre aproximadamente 1 y 10 nM, aunque algunas preparaciones comerciales que presentan una pureza inferior al 90% presentan una EC_{50} superior debido presumiblemente a la presencia de

contaminantes que resultan en una actividad medida más baja. Se proporcionan posteriormente y en las figuras 2 y 3 los resultados para los compuestos de ensayo.

En la preparación de músculo sóleo de rata aislado e incubado, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 no mostraron ninguna actividad discernible de agonista de amilina en la inhibición de la incorporación de la glucosa en glucógeno. En este ensayo, la insulina incrementó la incorporación del ^{14}C , derivado de glucosa marcada con ^{14}C en el medio de incubación, en glucógeno en un factor de 3 a 4 durante un periodo de 1 hora. A continuación, el glucógeno se extrajo de tiras de músculo sóleo incubado y se analizó. En este ensayo, se tipificó la acción de la amilina a partir de una reducción de la incorporación del ^{14}C procedente de la glucosa en glucógeno (mostrado en la presente memoria en la figura 2 en presencia de insulina). De esta manera, se indica el antagonismo de la acción de la amilina mediante la prevención de la reducción de la incorporación del ^{14}C en glucógeno mediada por la amilina.

Los resultados de los experimentos con Compuesto 1 y con Compuesto 2 se muestran en las figuras 2A y 2B. La figura 2A ilustra los resultados con el Compuesto 1, y la figura 2B ilustra los resultados con el Compuesto 2. La segunda columna en cada figura muestra el efecto estimulante de la insulina (1.000 unidades/ml, 7,1 nM) sobre la incorporación del ^{14}C procedente de la glucosa- ^{14}C . La tercera columna en cada figura muestra el efecto de la amilina (100 nM) sobre la reducción de la incorporación de ^{14}C estimulada por insulina procedente de la glucosa- ^{14}C hasta valores próximos a los observados en ausencia de insulina. La cuarta columna en cada figura muestra que ni el Compuesto 1 (100 nM) ni el Compuesto 2 (100 nM) afectaron a la respuesta a la insulina. Es decir, ni el Compuesto 1 ni el Compuesto 2 mostraron actividad agonista de amilina en este ensayo. En el quinto conjunto de columnas, se invirtió el efecto de la amilina (100 nM) sobre la incorporación estimulada por insulina de glucosa en glucógeno (7,1 nM) (tal como se muestra en el tercer conjunto de columnas) mediante la adición de Compuesto 1 (1 μM) o Compuesto 2 (1 μM). Es decir, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 mostraron actividad antagonista de amilina en este ensayo.

La figura 3 representa una curva de respuesta a dosis para la inversión por parte del Compuesto 1 de los efectos de la amilina de rata (100 nM) sobre la incorporación estimulada por insulina de ^{14}C en glucógeno procedente de la glucosa- ^{14}C en músculo sóleo aislado. El valor de IC_{50} del gráfico es aproximadamente 4 nM para el Compuesto 1.

EJEMPLO D

EFFECTO SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSA, LACTATO Y CALCIO

Se alojaron ratas Harlan Sprague-Dawley macho a $22,7^{\circ}\text{C} \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas (realizando los experimentos durante el ciclo de luz) y recibieron alimentos y agua *ad libitum* (Diest LM-485, Teklad, Madison, Wis.). Los animales utilizados presentaban edades de 87 a 94 días y pesaban entre 353 y 392 g. Se les privó de alimento durante las ~20 horas anteriores a la experimentación.

Se indujo anestesia con halotano al 5%, se mantuvo al 2% durante la cirugía y a 0,8-1% durante los registros. Se llevó a cabo traqueotomía y canulación de la arteria femoral derecha y vena safena. Se conectó la línea arterial femoral a un transductor de presión (transductor Spectramed P23XL, amplificador modelo 13-4615-58, Gould, Cleveland, Ohio) y se perfundió con solución salina heparinizada (2U/ml) a 3,0 ml/h. Se midió la temperatura colónica utilizando una sonda termistor y un controlador (modelo 73A, YSI, Yellow Springs, Ohio) que proporcionó un control de bucle cerrado de la temperatura central mediante activación de una mesa de operaciones caliente. La señal para la presión arterial media se muestreó periódicamente y se almacenó con una precisión de 12 bits a 1 Hz utilizando un sistema computerizado de adquisición de datos (convertidores A/D DT2801A, Data Translation, Marlboro, Mass.; ordenador AST Premium 386, AST Research, Irvine, Calif.; software Labtech Notebook, Laboratory Technologies Corp., Wilmington, Mass.).

Se sometió a ensayo la amilina sintética de rata (Bachem, Torrance, Calif.) para su capacidad de unirse en el ensayo de receptor de amilina, y para bioactividad utilizando el ensayo de músculo liso. Se prepararon los compuestos de ensayo mediante síntesis de péptidos en fase sólida tal como se ha descrito anteriormente.

Se utilizaron los grupos de tratamiento siguientes: (1) ratas de control (n=5) que, en t=0, recibieron inyecciones subcutáneas de 0,1 ml de solución salina 0,15 M, (2) ratas que recibieron una inyección de amilina (n=5) que, en t=0, recibieron 100 μg de amilina sintética de rata en 0,1 ml de solución salina en forma de un bolo subcutáneo en la pared abdominal ventral, y (3) ratas que recibieron una inyección de amilina seguida de la preinfusión de compuesto de ensayo (n=1). En el grupo 3, antes de la inyección subcutánea de amilina (tal como en el grupo 2) se realizó una infusión intravenosa cebada/continua de los compuestos de ensayo. Tras un bolo de dosis intravenosa de 0,5 mg de compuesto de ensayo a los 30 minutos, se realizó una infusión intravenosa de 1 mg/h de compuesto de ensayo hasta t=120 minutos.

Se extrajeron muestras arteriales de 250 μl en tubos Natelson no heparinizados a los -30, -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos (respecto a la inyección de amilina), se transfirieron a tubos MicroPhage con EDTA fría, se centrifugaron y el plasma separado se analizó inmediatamente para glucosa y lactato utilizando reacciones de enzima inmovilizado (glucosa oxidasa, L-lactato oxidasa, analizador modelo 2300-STAT, YSI, Yellow Springs, Ohio).

Se midió el nivel total plasmático de calcio utilizando un ensayo de unión de pigmento (complexona o-

cresolfaleína, procedimiento 587 de Sigma; Sigma, St. Louis, MO, USA).

Se comparó la respuesta a inyecciones subcutáneas de 100 µg de Compuesto 1 ó de Compuesto 2 a las obtenidas con 100 µg de amilina de rata o con un control de vehículo de solución salina. Típicamente se observa que las concentraciones plasmáticas de glucosa y de lactato se incrementan tras las inyecciones de amilina de rata. Esta respuesta a la amilina se ha interpretado como debida por lo menos parcialmente a la glucogenolisis mediada por amilina, la liberación de lactato del músculo y la posterior gluconeogénesis del lactato liberado. Además, típicamente se observa que caen los niveles plasmáticos de calcio; este efecto podría deberse a la acción de amilina en los receptores de calcitonina.

Las figuras 4A a 4C representan la respuesta de los niveles plasmáticos de glucosa (figura 4A), lactato (figura 4B) y calcio (figura 4C) en ratas anestesiadas tras la inyección subcutánea de Compuesto 1 en comparación con dichos niveles tras la inyección de amilina de rata o de un control de vehículo solución salina. Las figuras 5A a 5C muestran la respuesta de los niveles plasmáticos de glucosa (figura 5A), lactato (figura 5B) y calcio (figura 5C) en ratas anestesiadas tras la inyección del Compuesto 2 en comparación con dichos niveles tras la inyección de amilina de rata o control de vehículo solución salina.

Tal como se ilustra en las figuras 4A a 4C y 5A a 5C, ni el Compuesto 1 ni el Compuesto 2 incrementaron el lactato plasmático o la glucosa plasmática, un resultado consistente con su falta de agonismo de la amilina observado en el ensayo de músculo sóleo (ver el Ejemplo C). Los compuestos 1 y 2 causaron una caída de la concentración plasmática de calcio que concordaba con sus actividades como agonistas de la calcitonina.

EJEMPLO E

EFFECTO SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSA, LATATO Y CALCIO EN PRESENCIA DE AMILINA

Se anestesiaron con halotano ratas Harlan Sprague-Dawley macho (edad de entre 75 y 85 días, masa de entre 300 y 350 g) sometidas a ayuno durante 18 a 20 horas, y se canularon a través de la vena safena para las infusiones/inyecciones y a través de la arteria femoral para el muestreo de la glucosa/lactato/calcio y para el registro de la presión arterial. También se realizó un seguimiento de la tasa cardíaca mediante ECG.

Una hora y media después de la cirugía, se infundieron las ratas con un bolo de 1,5 mg de Compuesto 2, seguido de una infusión de 3 mg/hora durante 1,5 horas adicionales (t=0,5 a 1,0 hora). En t=0 horas (0,5 horas después del inicio de la infusión cebada/continua de compuesto de ensayo) se administró un bolo de 50 µg de amilina de rata seguido de una infusión de 50 µg/hora de amilina de rata que continuó hasta el final del experimento. Se recogieron muestras de sangre cada 10 minutos durante las primeras 2 horas del ensayo y posteriormente cada 30 minutos. Se realizó un registro continuo de la presión arterial media y de la tas cardíaca entre t=0,5 y t=+0,5 horas. Se terminó el estudio en t=6 horas. Se incluyó como control positivo un antagonista de amilina publicado anteriormente, AC253 (Prickett, K.S. *et al.*, "Design of Receptor Selection Peptides that Antagonize the Actions of Amylin *In vivo*", Peptides Chemistry Structure and Biology (Kaumaya y Hodges, editores), páginas 620 a 622, 1996).

Las figuras 6A a 6D representan los efectos del Compuesto 1 y del Compuesto 2 sobre la glucosa plasmática (figura 6A), el lactato plasmático (figura 6B), el calcio plasmático (figura 6C) y la presión arterial media (figura 6D) como función del tiempo tras la administración de amilina. En este protocolo, la actividad de antagonista de amilina de rata está indicada por la supresión del incremento de los niveles plasmáticos de glucosa y de lactato que típicamente se producen tras la administración de la amilina. Las preinfusiones con Compuesto 1 o Compuesto 2 resultaron en incrementos menores de los niveles de lactato y de glucosa que los observados en ratas de control preinfundidas con solución salina sólo, lo que indica que estos compuestos antagonizaron las acciones hiperlacémicas e hiperglucémicas de la amilina *in vivo*. Se inició una caída de los niveles plasmáticos de calcio tras la infusión de Compuesto 1 o de Compuesto 2 y no resultó modificada por la infusión posterior de amilina. Este efecto observado sobre el calcio plasmático se considera típico de la actividad agonista de amilina y de calcitonina. La falta de capacidad de estos compuestos de revertir el efecto de reducción de la presión sanguínea de la amilina, un efecto que es conocido que se encuentra mediado por los receptores de CGRP, demuestra la actividad selectiva de los compuestos de ensayo.

EJEMPLO F

ENSAYO DE VACIADO GÁSTRICO DE ROJO FENOL

Se midió el vaciado gástrico utilizando una modificación (Plourde *et al.*, Life Sci. 53:857-862, 1993) del método original de Scarpignato *et al.* (Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 246:286-295, 1980). Mediante sonda gástrica ratas conscientes recibieron 1,5 ml de un gel calórico que contenía metilcelulosa al 1,5% (M-0262, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e indicador rojo fenol al 0,05%. Veinte minutos después de introducir la sonda, las ratas fueron anestesiadas utilizando halotano al 5%, se expuso el estómago y se pinzó en los esfínteres pilórico y esofágico inferior utilizando fórceps arterial, se extrajo y se abrió en una solución alcalina que se enrasó a un volumen fijo. Se derivó el contenido del estómago a partir de la intensidad del rojo fenol en la solución alcalina, se midió a partir de la

absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En la mayoría de experimentos, el estómago se encontraba vacío. En otros experimentos, se centrifugó el contenido gástrico particulado para clarificar la solución para las mediciones de absorbancia. En el caso de que el contenido gástrico diluido siguiese encontrándose turbio, se derivaba la absorbancia espectroscópica debida al rojo fenol como la diferencia entre la presente en diluyente alcalino y la presente en diluyente acidificado. En experimentos separados en 7 ratas, se extirpó tanto estómago como intestino delgado y se abrieron en una solución alcalina. La cantidad de rojo fenol que pudo recuperarse del tracto gastrointestinal superior dentro de los 29 minutos posteriores a la introducción de la sonda fue de $89 \pm 4\%$; el pigmento que aparentemente se habría unido irrecuperablemente a la superficie luminal del tracto gastrointestinal podría explicar las pérdidas. Para compensar esta pequeña pérdida, se expresó el porcentaje de contenido del estómago restante tras 20 minutos como una fracción del contenido gástrico recuperado de ratas de control sacrificadas inmediatamente tras la introducción de la sonda gástrica en el mismo experimento. Porcentaje de contenido restante del vaciado gástrico = $(\text{absorbancia a los 20 minutos}) / (\text{absorbancia en } t=0)$. Las curvas de respuesta a dosis para el vaciado gástrico se ajustaron a un modelo logístico de 4 parámetros utilizando una rutina iterativa de cuadrados mínimos (ALLFIT, v2.7, NIH, Bethesda, MD) para derivar las ED_{50} . Debido a que ED_{50} presenta una distribución log-normal, se expresa $\pm$ error estándar del logaritmo. Se llevaron a cabo comparaciones apareadas utilizando el análisis de la varianza unidireccional y el ensayo de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (Instat v2.0, software GraphPad, San Diego, CA) utilizando $P < 0,05$ como nivel de significancia.

En estudios de respuesta a dosis, se administró amilina de rata (Bachem, Torrance, CA) disuelta en solución salina 0,15 M, en forma de un bolo subcutáneo de 0,1 ml en dosis de 0, 0,01, 0,1, 1, 10 ó 100 μg 5 minutos antes de introducir la sonda gástrica en ratas Harlan Sprague-Dawley (no diabéticas) sometidas a ayuno durante 20 horas y en ratas BB diabéticas sometidas a ayuno durante 6 horas. Al administrar inyecciones subcutáneas de amilina 5 minutos antes de introducir la sonda con indicador rojo fenol, se produjo una supresión dependiente de la dosis del vaciado gástrico (datos no mostrados). Se completó la supresión del vaciado gástrico en ratas HSD normales que recibieron la administración de 1 μg de amilina, y en ratas diabéticas en las que se habían administrado 10 μg ($P = 0,22$, 0,14). La ED_{50} para la inhibición del vaciado gástrico en ratas normales fue de 0,43 μg (0,60 nmoles/kg) $\pm$ 0,19 unidades logarítmicas, y fue de 2,2 μg (2,3 nmoles/kg) $\pm$ 0,18 unidades logarítmicas en ratas diabéticas.

La amilina (de rata o humana) y los compuestos que muestran acciones similares a la amilina en músculo sóleo aislado (incluyendo la calcitonina de salmón, el CGRP y la calcitonina de rata) se ha observado que inhiben de manera dependiente de la dosis el vaciado gástrico en el presente modelo de rata consciente. La adrenomedulina, que se ha observado que se comporta como un agonista de CGRP pero no como una amilina o un agonista de la calcitonina, no inhibe el vaciado gástrico a las dosis más altas (100 μg) utilizadas en dicho modelo (indicando que la inhibición del vaciado gástrico en este modelo es improbable que se encuentre mediada por los receptores de CGRP).

Tal como se muestra en la figura 7, la amilina y la calcitonina de rata presentaban potencias similares en la inhibición del vaciado gástrico (ED_{50} de 0,21 y 0,41 $\mu\text{g}/\text{rata}$, respectivamente; n.s.). La calcitonina de salmón era más potente que la calcitonina de rata en su efecto de inhibición del vaciado gástrico (ED_{50} 0,12 $\mu\text{g}/\text{rata}$; $P < 0,03$). Tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 se comportó como potentes agonistas de amilina y de calcitonina en la inhibición del vaciado gástrico.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:

X₁-X₂-X₃-Leu-X₄-Glu-Leu-X₅-X₆-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-

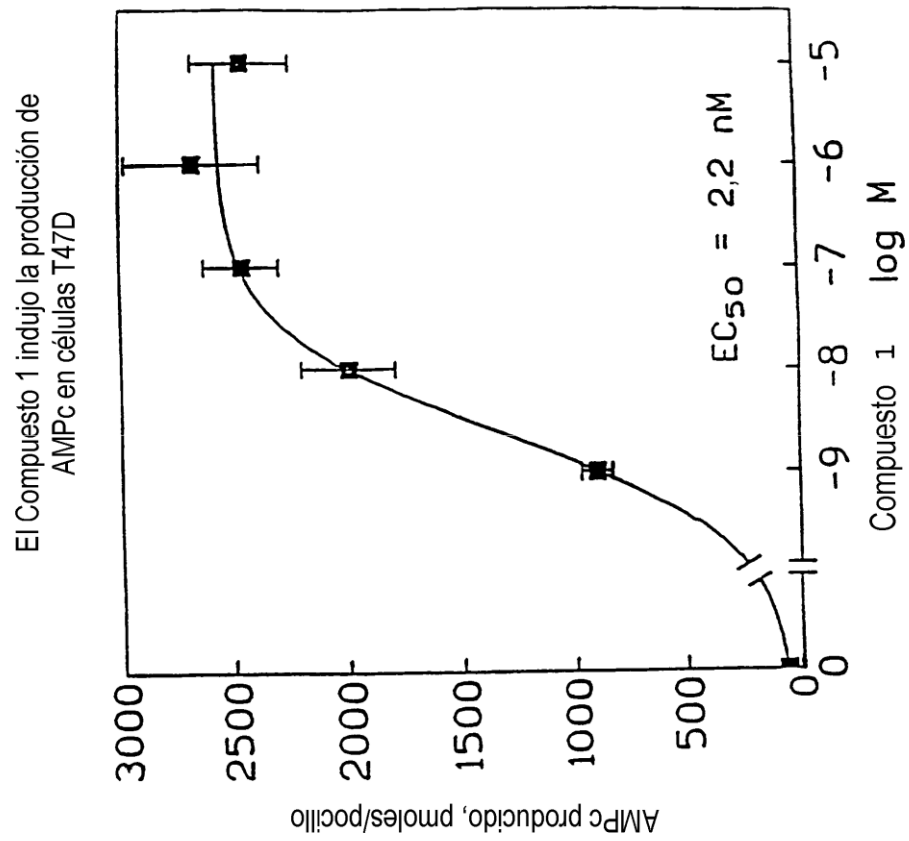
Thr-Asn-X₇-Z₃ [SEC ID nº 27] en la que:

- 5 (a) X₁ es Z₁-Ser-Thr-Z₂-Val-Leu [SEC ID nº 28], en la que Z₁ es un grupo alcanoílo; y
Z₂ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Ala, Ser, Cys, y Thr;
- (b) X₂ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Gly, Glu, Asn o Aib;
- (c) X₃ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn, Lys y Lys ε-amidado con ácido acético;
- 10 (d) X₄ es un grupo de dos residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por Ser-Gln, Thr-Gln, Ala-Asn y Thr-Asn;
- (e) X₅ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por His, Aib, Ile, Leu y Val;
- (f) X₆ es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por Arg, Orn y Lys y derivados ε-amidados de los mismos, tales como Lys ε-amidado con ácido fórmico (Lys(For));
- 15 (g) X₇ es un grupo que presenta 6 residuos aminoácidos seleccionados de entre el grupo constituido por:
- (i) Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 29]
- (ii) Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 30]
- (iii) Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 31]
- (iv) Val-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 32]; y
- 20 (h) Z₃ es OH o NH₂;
- con la condición de que el compuesto no presente la fórmula de cualquiera de las secuencias SEC ID nº 20 ó 22 a 26;
- y sus sales farmacéuticamente aceptables;
- o un compuesto de fórmula:
- 25 • 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 2]; o
- 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Ala-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 10]; o
- 30 • 4-metilpentanoil-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-Aib-Lys(For)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 11],
- y sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z₃ es NH₂.
3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X₂ es Gly.
4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que X₅ es His o Aib.
- 35 5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que X₄ es Ser-Gln.
6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que X₇ es:
- Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr [SEC ID nº 29] o
- Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro [SEC ID nº 30].
7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z₁ es un grupo alcanoílo que presenta de 1 a
- 40 aproximadamente 10 átomos de carbono o Leu.

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que Z_2 es Ala o Cys.
 9. Compuesto según la reivindicación 1, en el que X_3 y X_6 se encuentran acetamidados.
 10. Compuesto según la reivindicación 9, en el que Z_2 es Ala.
 11. Compuesto según la reivindicación 10, en el que Z_1 es 4-metilpentanoílo.
- 5 12. Composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento
- 10 (a) destinado al tratamiento de la diabetes en un sujeto que necesita tratamiento;
- (b) destinado a regular beneficiosamente la motilidad gastrointestinal en un sujeto; o
- (c) destinado a tratar un trastorno seleccionado de entre el grupo constituido por: tolerancia alterada a la glucosa; hiperglucemia posprandial; obesidad; y síndrome X; en un sujeto.
14. Utilización según la reivindicación 13, en la que dicha diabetes es la diabetes de tipo I o la diabetes de tipo II.
- 15 15. Utilización según la reivindicación 13, en la que dicha regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal comprende retrasar el vaciado gástrico.

1 / 17

Figura 1



2 / 17

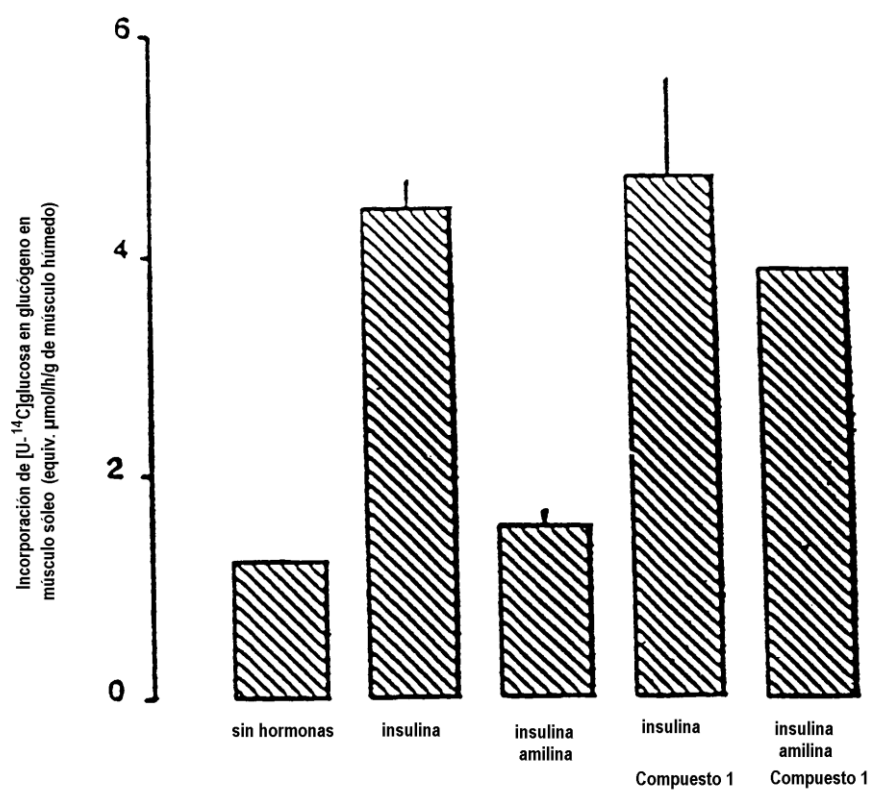


Figura 2A

3 / 17

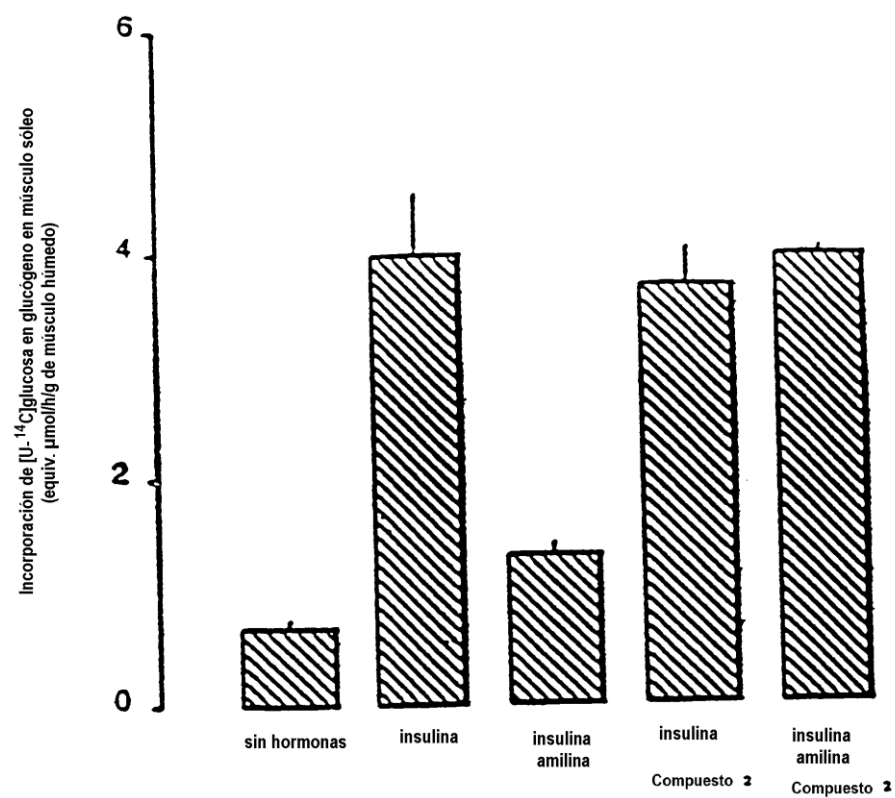


Figura 2B

4 / 17

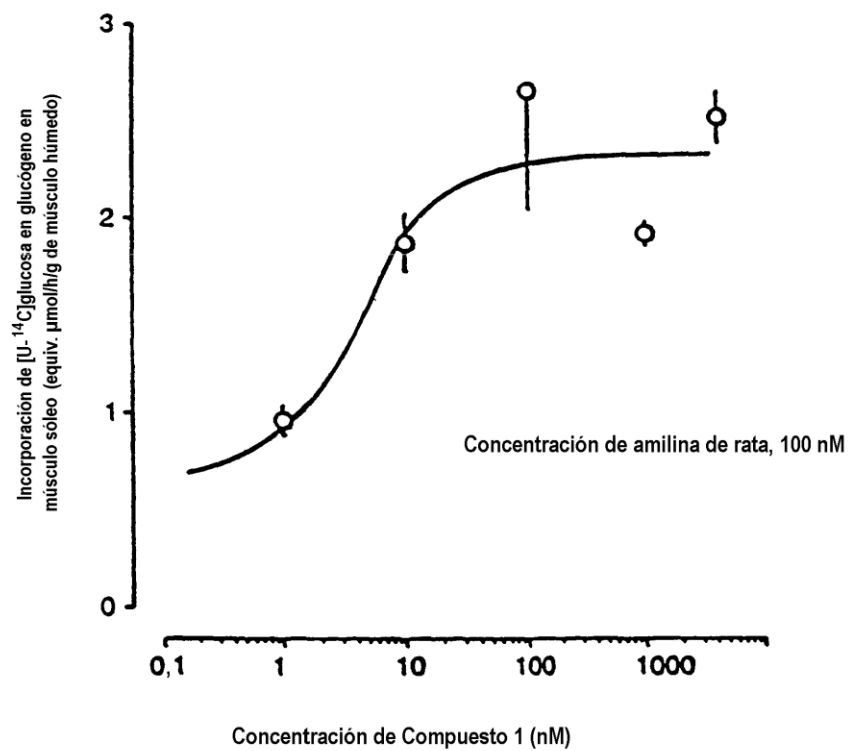


Figura 3

5 / 17

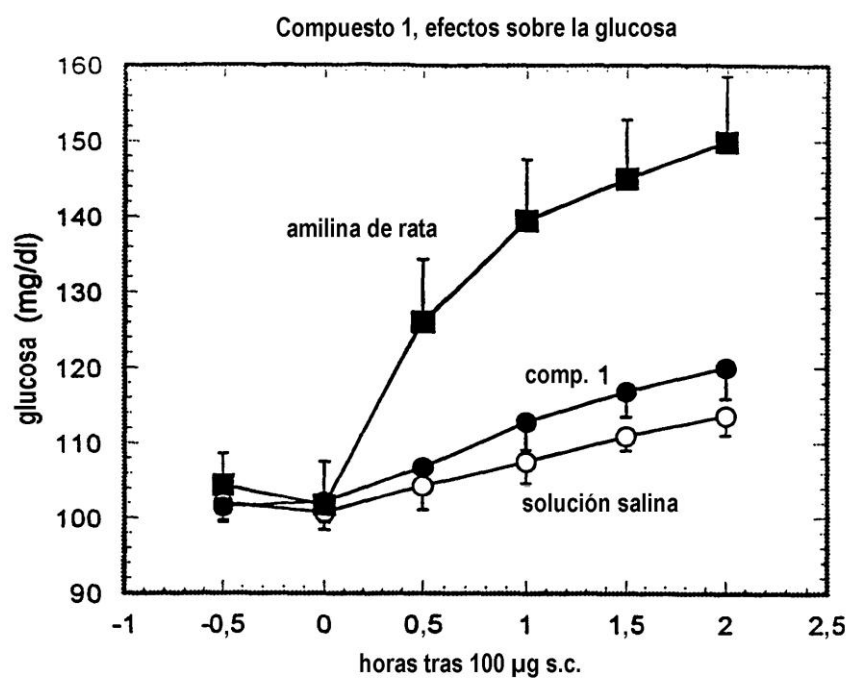


FIGURA 4A

6 / 17

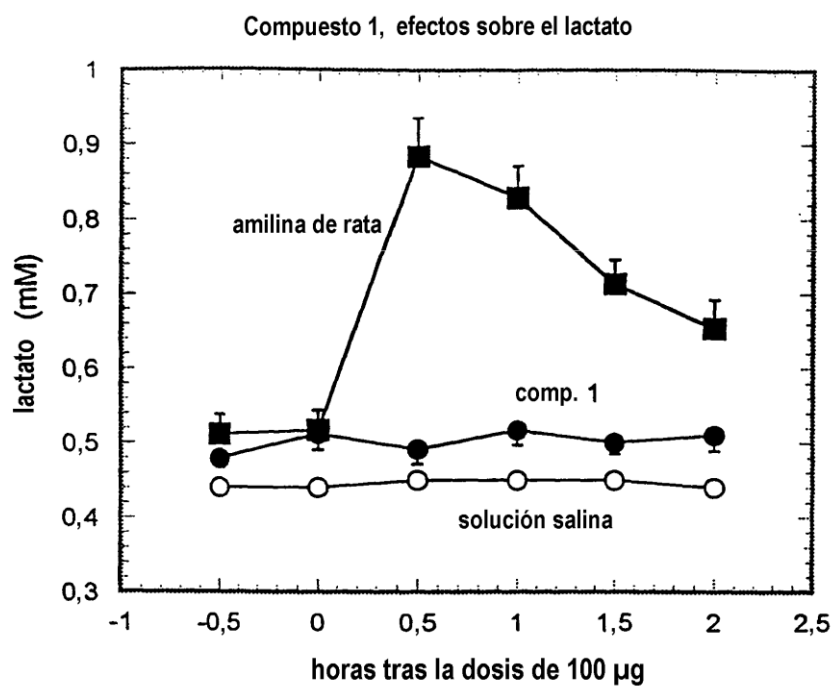


FIGURA 4B

7 / 17

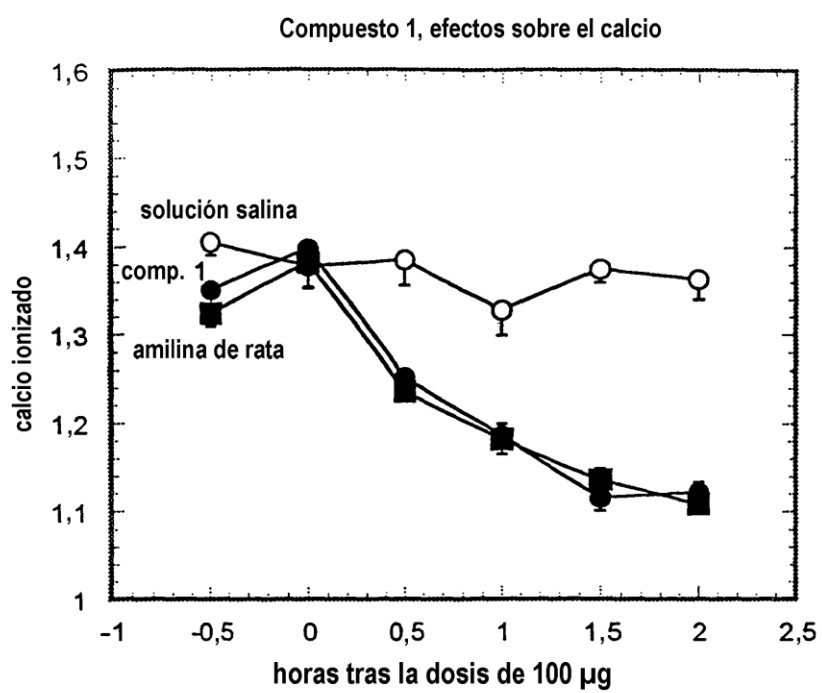


FIGURA 4C

8 / 17

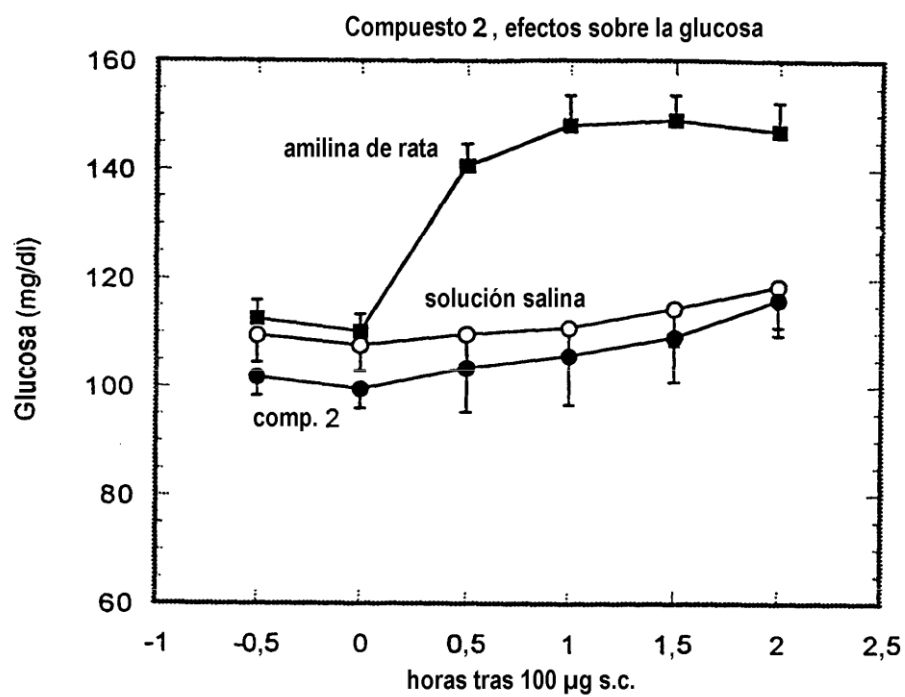


FIGURA 5A

9 / 17

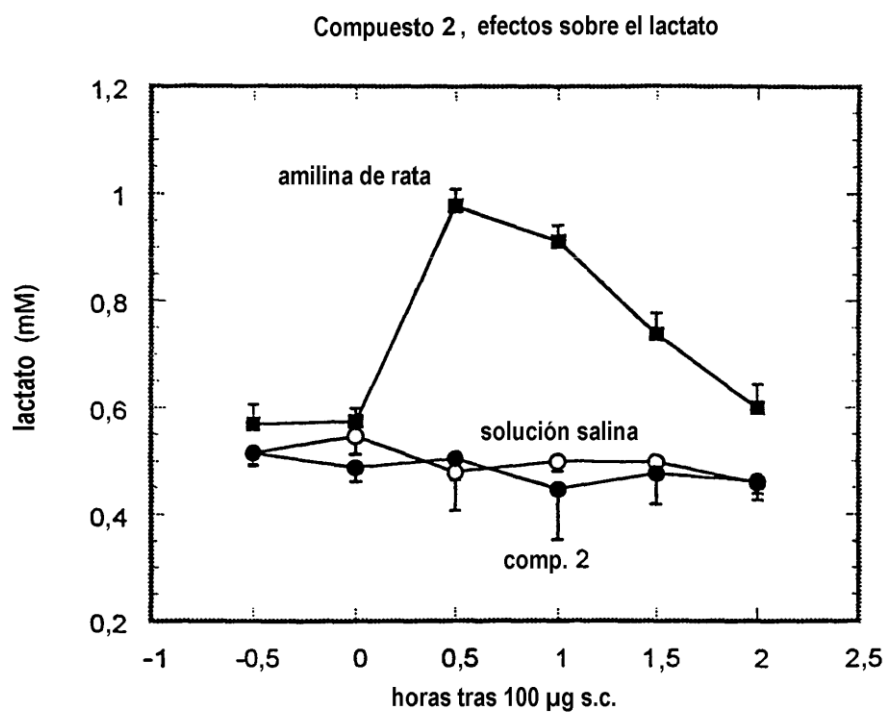


FIGURA 5B

10 / 17

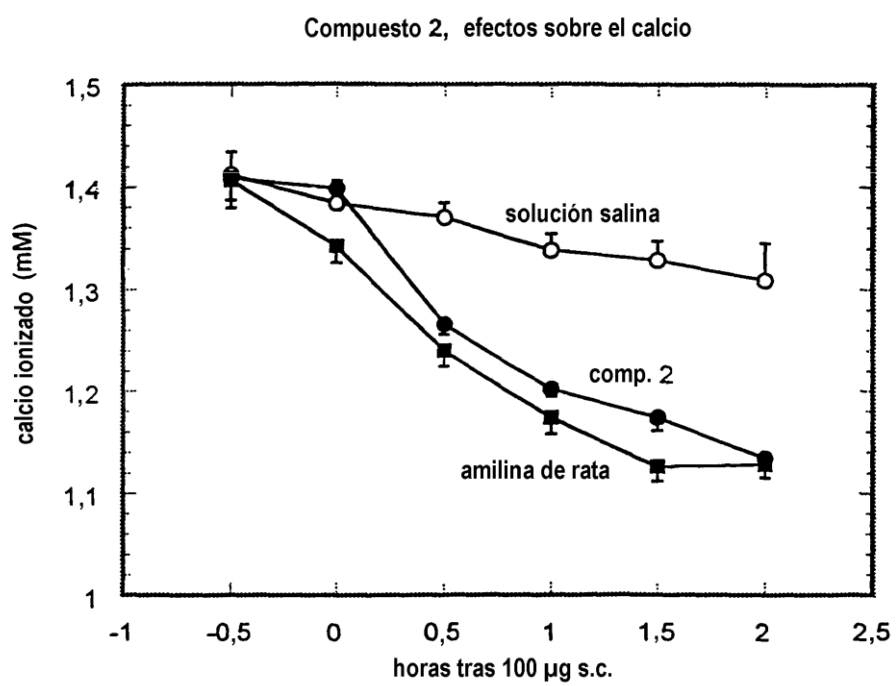


FIGURA 5C

11 / 17

Antagonismo de efectos de la amilina de rata sobre la glucosa

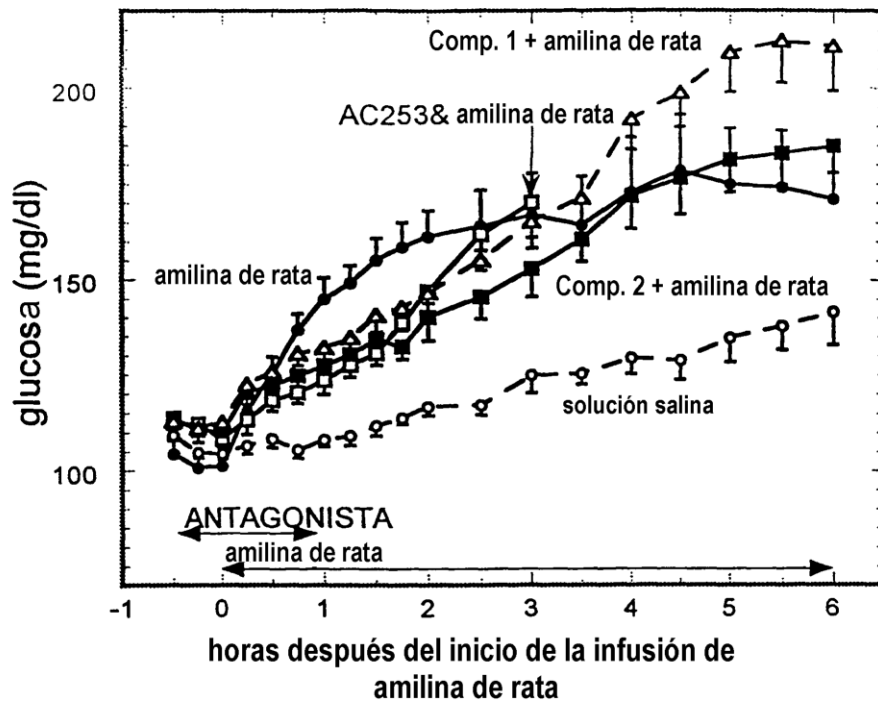


FIGURA 6A

12 / 17

Antagonismo de efectos de la amilina de rata sobre el lactato

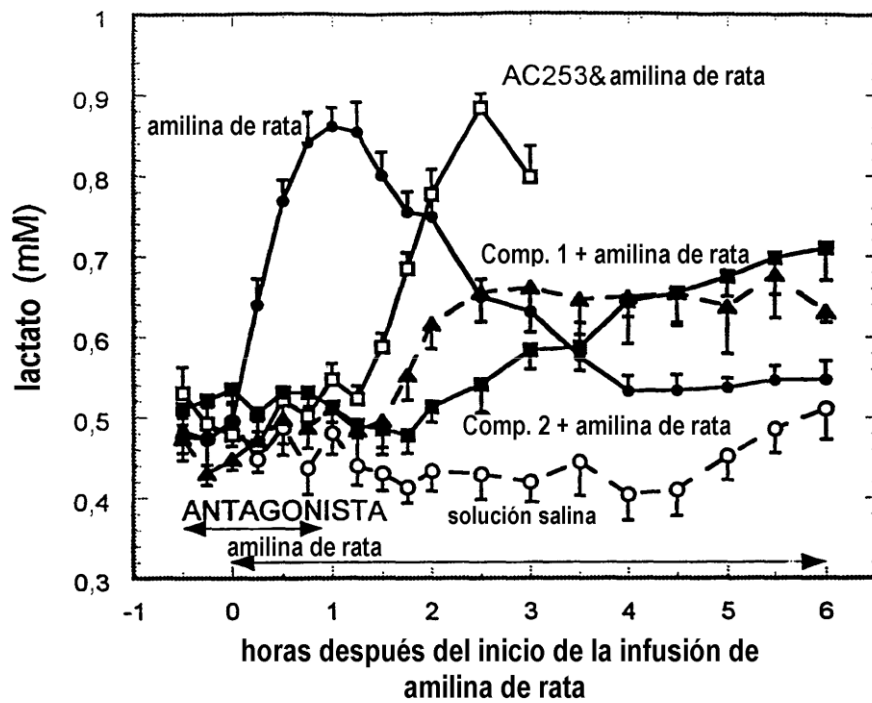


FIGURA 6B

13 / 17

Antagonismo de efectos de la amilina de rata sobre calcio

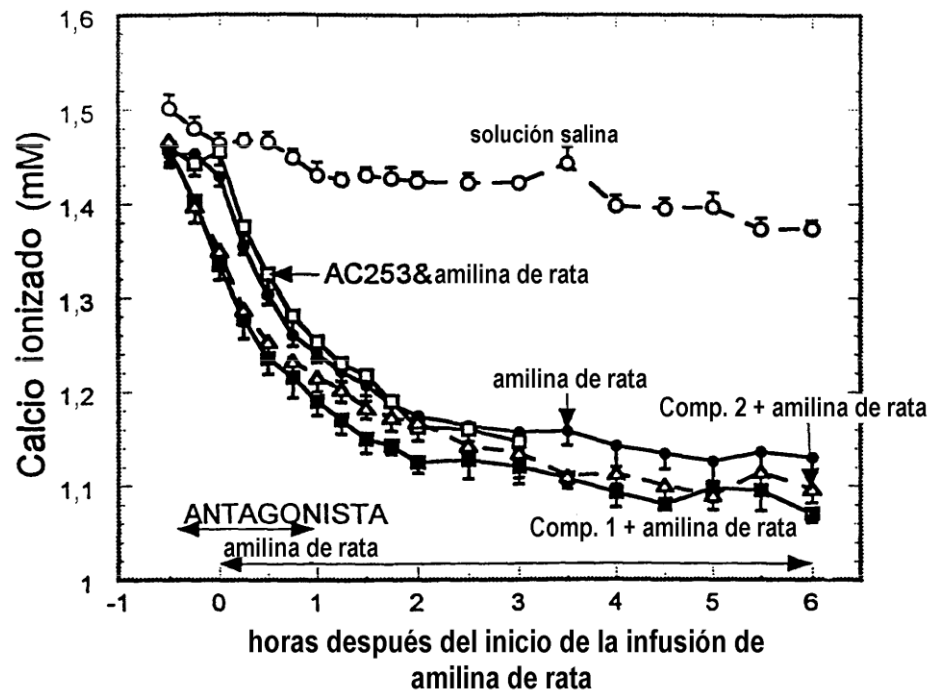


FIGURA 6C

14 / 17

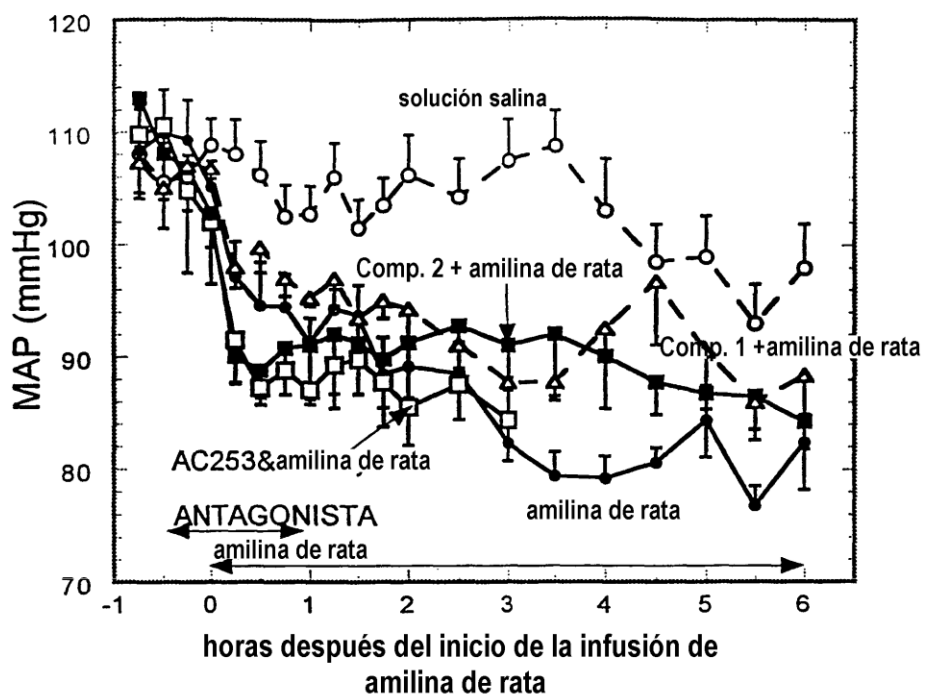
Antagonismo de efectos de la amilina de rata sobre MAP

FIGURA 6D

15 / 17

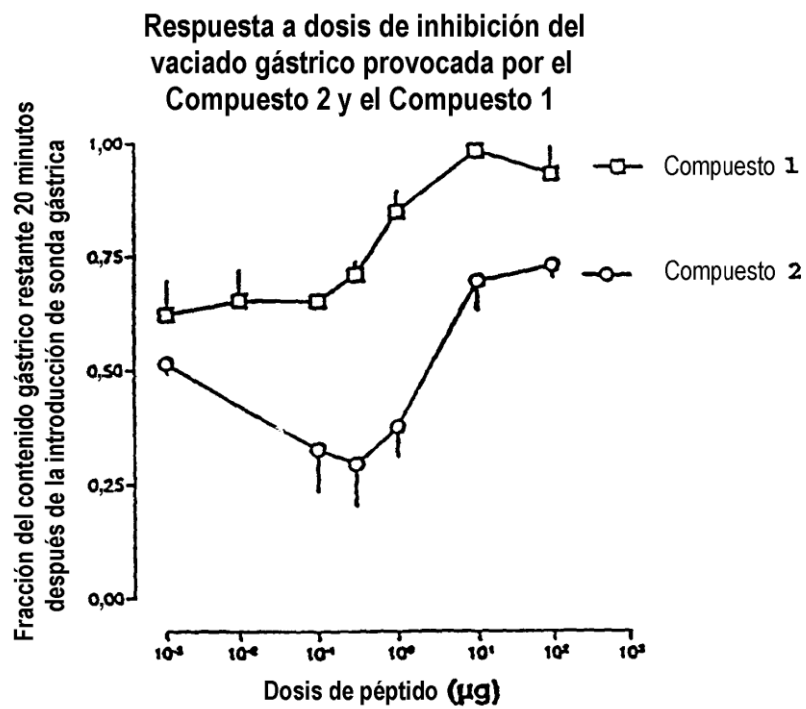


FIGURA 7

FIGURA 8

Compuestos de fórmula: $X_1-X_2-X_3-X_4$ -Gln-Leu-X₅-X₆-Gln-Thr-Tyr-Pro-Eg-Thr-an-X₇-NH₂

CPD. SEC. ID. NO.	X ₁											X ₂											X ₃											X ₄											X ₅											X ₆											X ₇											X ₈																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	Leu Ser Thr Cys Val Leu											Gly Arg											Leu Ser Gln Gln Leu											Gln Leu											His Arg											Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An											Thr Gln Thr Tyr Pro Arg Thr An										

17 / 17

FIGURA 9
Compuestos de fórmula: $X_1-X_2-X_3$ -Leu- X_4 -Glu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Aan- X_5 -NH₂

SUC. ID. NO.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{19}	X_{20}	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}
14	Leu Ser Thr Cys Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
15		Val Leu	Gly	Lys	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
16		Val Leu	Gly	Lys	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Aan Thr Tyr	NH ₂															
17		(AcNH) Val Leu	Gly	Lys	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Aan Thr Tyr	NH ₂															
18	Ac- Leu Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
19	Ac- Leu Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	Alb	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
20	Isocaproil- Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
21	H Leu Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
22	Adamantacetil- Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
23	CH ₃ CO Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
24	Ciclohexilpropionil- Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
25	Ciclohexilpropionil- Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															
26	Decanoil- Ser Thr Ala Val Leu	Gly	Lys	Leu	Ser Gln	Glu Leu	His	Lys	Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Aan	Thr Gly Ser Gly Thr Pro	NH ₂															