

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 497**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/575** (2006.01)  
**A61K 38/10** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06830133 .2**  
96 Fecha de presentación: **27.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1962959**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Agonistas del receptor del neuropéptido-2**

30 Prioridad:  
**07.12.2005 US 748071 P**  
**30.10.2006 US 855249 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.05.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**  
**GRENZACHERSTRASSE 124**  
**4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**CONDE-KNAPE, Karin;**  
**DANHO, Waleed;**  
**EHRlich, George;**  
**FOTOUHI, Nader;**  
**FRY, David C.;**  
**KHAN, Wajiha;**  
**KONKAR, Anish;**  
**RONDINONE, Cristina Martha;**  
**SWISTOK, Joseph;**  
**TAUB, Rebecca Anne y**  
**TILLEY, Jefferson W.**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

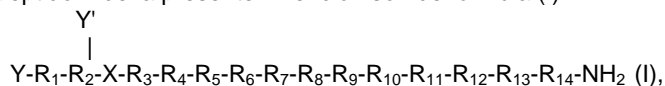
ES 2 381 497 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Agonistas del receptor del neuropéptido-2

La invención se refiere a análogos truncados de PYY<sub>3-36</sub>. Los análogos son agonistas del receptor del neuropéptido-2 y son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos metabólicos, como, por ejemplo, la obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y dislipidemia. Los agonistas del receptor del neuropéptido-2 de la presente invención son de fórmula (I)



10 en la que:

X es ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolina-acético (Pqa),

Y es H, una porción acilo, un alquilo sustituido o no sustituido, un alquilo inferior sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alcoxi sustituido o no sustituido, una porción poli(etilenglicol), PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC,

15 Y' es H, una porción poli(etilenglicol), PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC,

R<sub>1</sub> es Ile, Ala, (D)Ile, N-metil Ile, Aib, 1-1Aic, 2-2Aic, Ach o Acp,

R<sub>2</sub> es Lys, Ala, (D)Lys, NMeLys, Nle o (Lys-Gly),

R<sub>3</sub> es Arg, Ala, (D)Arg, N-metil Arg, Phe, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,

R<sub>4</sub> es His, Ala, (D)His, N-metil His, 4-MeOapc, 3-Pal o 4-Pal,

20 R<sub>5</sub> es Tyr, Ala, (D)Tyr, N-metil Tyr, Trp, Tic, Bip, Dip, (1)Nal, (2)Nal, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,

R<sub>6</sub> es Leu, Ala, (D)Leu o N-metil Leu,

R<sub>7</sub> es Asn, Ala o (D)Asn,

R<sub>8</sub> es Leu o Trp,

R<sub>9</sub> es Val, Ala, (D)Val o N-metil Val,

25 R<sub>10</sub> es Thr, Ala o N-metil Thr,

R<sub>11</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,

R<sub>12</sub> es Gln o Ala,

R<sub>13</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,

R<sub>14</sub> es Tyr, (D)Tyr o N-metil Tyr, Tyr modificada, Phe, Phe modificada, Cha, (1)Nal, (2)Nal, C-alfa-metil Tyr o Trp, y

30 PEGm es de entre 1 y 60 KDa,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las enfermedades y trastornos metabólicos son ampliamente reconocidos como problemas de salud graves en los países desarrollados, y han alcanzado niveles epidémicos en los Estados Unidos. De acuerdo con estudios recientes sobre la obesidad, por ejemplo, más del 50% de la población estadounidense se considera que tiene sobrepeso, con más del 25% diagnosticados como clínicamente obesos y con un riesgo considerable de enfermedad cardiaca, diabetes tipo 2 y determinados tumores. Esta epidemia representa una carga significativa para el sistema de cuidado de salud ya que la previsión de los costes del tratamiento de la obesidad es de más de 70 billones de dólares anuales solamente en los EEUU. Las estrategias para tratar la obesidad incluyen la reducción de la ingesta de comida y el aumento del gasto de energía.

El neuropéptido Y (NPY), un péptido neurotransmisor de 36 aminoácidos, es un miembro de la clase de neurotransmisores/ neurohormonas polipeptídicas pancreáticas, que se ha demostrado que está presente tanto en el sistema nervioso periférico como en el central. El NPY es uno de los agentes orexigénicos más potentes conocidos y se ha demostrado que tiene un papel esencial en la regulación de la ingesta de comida en animales, lo que incluye los humanos.

Se han clonado seis receptores del neuropéptido Y (NPY), los subtipos Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 y Y6, que pertenecen a los receptores tipo rodopsina, acoplados a proteína-G, que se disponen en 7 dominios transmembrana (GPCR). El receptor NPY Y2 (Y2R) es un receptor de 381 aminoácidos que inhibe la activación de la adenilciclase a través de Gi, mientras que muestra una baja homología con otros receptores NPY conocidos. Existe un alto grado de conservación entre los receptores Y2 de rata y humano, con un 98% de identidad de los aminoácidos.

El receptor Y2R está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central tanto en roedores como en humanos. En el hipotálamo, el mRNA del Y2 se localiza en el núcleo arcuato, núcleo preóptico y núcleo dorsomedial. En el cerebro humano, el Y2R es el subtipo de receptor Y predominante. En el núcleo arcuato, más del 80% de las neuronas NPY coexpresan el mRNA de Y2R. Se ha demostrado que la aplicación de un agonista selectivo para Y2 reduce la liberación de NPY en cortes de hipotálamo *in vitro*, mientras que el antagonista no peptídico de Y2 BIIE0246 aumenta la liberación de NPY. Estos hallazgos apoyan el papel de Y2R como un autoreceptor presináptico que regula la liberación de NPY y por tanto puede estar involucrado en la regulación de la ingesta. (Kaga T *et al.*, Peptides 22: 501-506 (2001) y King PJ *et al.*, Eur J Pharmacol 396: R1-3(2000)).

El péptido YY<sub>3-36</sub> (PYY<sub>3-36</sub>) es un péptido lineal de 34 aminoácidos con actividad agonista del neuropéptido Y2 (NPY2R). Se ha demostrado que la inyección intra-arcuato (IC) o intra-peritoneal (IP) de PYY<sub>3-36</sub> reduce la ingesta

en ratas y, como un tratamiento crónico, reduce el aumento de peso corporal. La infusión intra-venosa (IV) (0,8 pmol/kg/min) durante 90 min de PYY<sub>3-36</sub> reduce la ingesta de comida en sujetos humanos obesos y normales durante 24 horas. Estos hallazgos sugieren que el sistema PYY puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad. (Batterham RL *et al.*, Nature 418: 650-654 (2002); Batterham RL *et al.*, New Engl J Med 349: 941-948 (2003)). Además, una versión Cys<sup>2</sup>-(D)Cys<sup>27</sup>-ciclada del PYY, en el que los residuos 5-24 se reemplazan por una cadena metileno de 5 a 8 átomos de carbono de longitud, condujo a una activación del receptor del PYY intestinal, como se evidencia mediante la reducción de corriente a lo largo de preparaciones de mucosa de yeyuno de rata conectadas a voltaje. (Krstensky, *et al.* en Peptides, Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium. Editores J. Smith y J. Rivier, ESCOM. Leiden Págs. 136-137).

Además, se ha descrito la modificación covalente de proteínas con poli(etilenglicol) o poli(etilenoóxido) (ambas denominadas PEG), con superóxido dismutasa (Somack R, *et al.*, (1991) Free Rad Res Commun 12-13:553-562; patente EEUU N° 5.283.317 y 5.468.478) y de otros tipos de proteínas, por ejemplo, citoquinas (Saifer M G P, *et al.*, (1997) Polym Preprints 38:576-577; Sherman M R, *et al.*, (1997) en J M Harris, *et al.*, (Editores), Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications. ACS Symposium Serie 680 (págs. 155-169) Washington, D.C.: American Chemical Society).

Además, datos recientes han demostrado que los pacientes con un bypass gástrico tienen un aumento temprano y exagerado de los niveles de PYY que pueden ser parcialmente responsables del control glucémico temprano y el mantenimiento del peso a largo plazo, lo que demuestra la importancia de este péptido en la patogénesis de las enfermedades metabólicas. Otras acciones conocidas del PYY incluyen: el vaciado gástrico reducido y el retraso del tránsito gastrointestinal que es responsable de la mejora del control glucémico postprandial. Los índices de hiperglucemia como la HbA<sub>1c</sub> y la fructosamina muestran una reducción dependiente de dosis tras la administración periférica del PYY<sub>3-36</sub> en modelos animales de diabetes tipo 2. Por lo tanto, estos resultados indican que es PYY<sub>3-36</sub>, o los agonistas farmacéuticamente relacionados, pueden ofrecer una aproximación terapéutica a largo plazo para el control glucémico y del peso. (Korner *et al.*, J Clin Endocrinol Metabol 90: 359-365 (2005); Chan JL *et al.*, Obesity 14: 194-198 (2006); Stratis C *et al.*, Obes Surg 16: 752-758 (2006); Borg CM *et al.*, Br J Surg 93: 210-215 (2006); y Pittner RA *et al.*, Int J Obes 28: 963-971 (2004)).

Sin embargo, existe la necesidad de nuevos análogos del PYY diseñados con un peso molecular inferior, pero que tengan la misma o una mayor potencia y selectividad frente a los receptores Y1, Y4 y Y5, propiedades farmacocinéticas y propiedades farmacológicas. Preferiblemente, existe la necesidad de compuestos con una actividad de mayor duración que la de los que estaban disponibles previamente. También existe la necesidad de análogos pegilados del PYY para, por ejemplo, aumentar la vida media de la proteína y reducir la inmunogenicidad en los sujetos en necesidad de tales agonistas.

La Figura 1 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción que contiene un compuesto (ejemplo 34) de la presente invención.

La Figura 2 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 34) de la presente invención.

La Figura 3 muestra un espectro de MALDI-TOF de un compuesto (ejemplo 34) de la presente invención.

La Figura 4 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de otro compuesto (ejemplo 35) de la presente invención.

La Figura 5 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 35) de la presente invención.

La Figura 6 muestra un espectro de MALDI-TOF de un compuesto (ejemplo 35) de la presente invención.

La Figura 7 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de un compuesto (ejemplo 36) de la presente invención.

La Figura 8 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 36) de la presente invención.

La Figura 9 muestra un espectro de MALDI-TOF de otro compuesto (ejemplo 36) de la presente invención.

La Figura 10 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de un compuesto (ejemplo 37) de la presente invención.

La Figura 11 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 37) de la presente invención.

La Figura 12 muestra un espectro de MALDI-TOF de un compuesto (ejemplo 37) de la presente invención.

La Figura 13 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de otro compuesto (ejemplo 38) de la presente invención.

La Figura 14 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 38) de la presente invención.

La Figura 15 muestra un espectro de MALDI-TOF de un compuesto (ejemplo 38) de la presente invención.

La Figura 16 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción de un compuesto (ejemplo 39) de la presente invención.

La Figura 17 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 39) de la presente invención.

La Figura 18 muestra un espectro de MALDI-TOF de otro compuesto (ejemplo 39) de la presente invención.

La Figura 19 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción que contiene un compuesto (ejemplo 41) de la presente invención antes de la desprotección.

La Figura 20 muestra un cromatograma de HPLC de una mezcla de reacción desprotegida que contiene un compuesto (ejemplo 41) de la presente invención.

La Figura 21 muestra un cromatograma de HPLC de un compuesto purificado (ejemplo 41) de la presente invención.

La Figura 22 muestra un espectro de MALDI-TOF de un compuesto (ejemplo 41) de la presente invención.

La Figura 23 muestra el efecto de la dosificación sub-crónica de un compuesto (ejemplo 41) sobre el peso corporal en ratas macho obesas inducidas por la dieta (DIO).

La Figura 24 muestra el efecto agudo de un compuesto (ejemplo 41) en una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT) en ratones hembra *db/db*.

La Figura 25 muestra el efecto de la dosificación sub-crónica de un compuesto (ejemplo 41) sobre los niveles basales de glucosa en sangre (A) y prueba oral de tolerancia a la glucosa (B) en ratones hembra *db/db*.

Aunque en la práctica o comprobación de la invención puede utilizarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos aquí, los métodos, dispositivos y materiales preferibles se describen a continuación.

Todas las secuencias de los péptidos mencionados aquí están escritas según la convención típica en la que el aminoácido N-terminal se sitúa a la izquierda y el aminoácido C-terminal se sitúa a la derecha, a menos que se indique de otro modo. Un pequeño guión entre dos residuos de aminoácido indica un enlace peptídico. Si el aminoácido tiene formas isoméricas, se representa la forma L del aminoácido a menos que se indique expresamente de otro modo. Por conveniencia en la descripción de esta invención, se utilizan las abreviaturas convencionales y no convencionales para los diferentes aminoácidos. Estas abreviaturas son familiares para aquellos versados en la materia, pero se listan a continuación para mayor claridad:

Asp= D= Ácido aspártico; Ala= A= Alanina; Arg= R= Arginina; Asn= N= Asparagina;  
Gly= G= Glicina; Glu= E= Ácido glutámico; Gln= Q= Glutamina; His= H= Histidina;  
Ile= I= Isoleucina; Leu= L= Leucina; Lys= K= Lisina; Met= M= Metionina;  
Phe= F= Fenilalanina; Pro= P= Prolina; Ser= S= Serina; Thr= T= Treonina;  
Trp= W= Triptófano; Tyr= Y= Tirosina; Cys= C= Cisteína y Val= V= Valina; Nle= Norleucina.

También por conveniencia, se utilizan las siguientes abreviaturas o símbolos para representar las porciones, reactivos y similares utilizados en esta invención:

Ac: acetilo;  
Aib: ácido alfa-aminoisobutírico;  
1-1-Aic: ácido 1-aminoindan-1-carboxílico;  
2-2-Aic: ácido 2-aminoindan-2-carboxílico;  
Ach: ácido alfa-aminociclohexan-carboxílico;  
Acp: ácido alfa-aminociclopentan-carboxílico;  
Tic: ácido alfa-amino-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico;  
3-Pal: ácido alfa-amino-3-piridilalanina-carboxílico;  
4-Pal: ácido alfa-amino-4-piridilalanina-carboxílico;  
4-MeO-Apc: ácido 1-amino-4-(4-metoxifenil)-ciclohexan-1-carboxílico;  
Bip: ácido 4-fenil-fenilalanina-carboxílico;  
Dip: ácido 3,3-difenilalanina-carboxílico;  
Pqa: ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolina-acético.  
3,4,5, F3-Phe: 3,4,5-Trifluoro fenilalanina;

- 2,3,4,5,6, F5-Phe: 2,3,4,5,6-Pentafluoro fenilalanina;  
 Cha: Ciclohexil Alanina;  
 (1)Nal: 1-Naftil Alanina;  
 (2)Nal: 2-Naftil Alanina;  
 5 Fmoc: 9-Fluorenilmetiloxycarbonilo;  
 Mtt: 4-Metiltrilito;  
 2Pip: Éster de 2-fenilisopropilo;  
 Pmc: 2,2,5,7,8-Pentametilcroman-6-sulfonilo;  
 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Cloruro de metileno;  
 10 A2O: Anhídrido acético;  
 CH<sub>3</sub>CN: Acetonitrilo;  
 DMAc: Dimetilacetamida;  
 DMF: Dimetilformamida;  
 DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina;  
 15 TFA: Ácido trifluoroacético;  
 HOBT: N-Hidroxibenzotriazol;  
 DIC: N,N'-Diisopropilcarbodiimida;  
 BOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-(dimetilamino)fosfonio;  
 HBTU: Hexafluorofosfato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio;  
 20 NMP: 1-metil 2-pirolidenona;  
 SSA: Succinimidil succinamida;  
 β-SBA: Ácido succinimidil beta-butanoico;  
 SPA: Ácido succinimidil propiónico;  
 25 BTC: Carbonato de benzotriazol;  
 MALDI-TOF: Desorción-ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo;  
 FAB-MS: Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos;  
 ES-MS: Espectrometría de masas por electropulverización;  
 PEG<sub>m</sub>-SSA: PEG<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-;  
 PEG<sub>m</sub>-β-SBA: PEG<sub>m</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CO-;  
 30 PEG<sub>m</sub>-SPA: PEG<sub>m</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-;  
 PEG<sub>m</sub>-BTC: PEG<sub>m</sub>-CO-; y  
 PEG<sub>m</sub>: es una porción poli(etileno)glicol mayor de alrededor de 1 KDa.

35 Como se usa aquí, el término "alquilo" significa un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado, cíclico o no cíclico, saturado o no saturado, que puede estar sustituido o no sustituido. Si es cíclico, el grupo alquilo es preferiblemente de C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub>, más preferiblemente de C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>, más preferiblemente de C<sub>5</sub> a C<sub>7</sub>. Si no es cíclico, el grupo alquilo es preferiblemente de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, más preferiblemente de C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, más preferiblemente metilo, etilo, propilo (n-propilo o isopropilo), butilo (n-butilo, isobutilo o butilo terciario) o pentilo (lo que incluye n-pentilo e isopentilo), más preferiblemente metilo. Se considerará, por lo tanto, que el término "alquilo" como se utiliza aquí incluye alquilo (ramificado o no ramificado), alquilo sustituido (ramificado o no ramificado), alquinilo sustituido (ramificado o no ramificado), cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, cicloalquinilo y cicloalquinilo sustituido. Los grupos alquilo preferibles son no cíclicos y saturados.

45 Como se utiliza aquí, el término "alquilo inferior" significa un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado, cíclico o no cíclico, saturado o no saturado, en el que dicho grupo alquilo inferior cíclico es un C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> o C<sub>7</sub>, y en el que dicho grupo alquilo inferior no cíclico es un C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>, y se selecciona preferiblemente de entre metilo, etilo, propilo (n-propilo o isopropilo) o butilo (n-butilo, isobutilo o butilo terciario). Se considerará, por lo tanto, que el término "alquilo inferior" como se utiliza aquí incluye un alquilo inferior (ramificado o no ramificado), un alqueno inferior (ramificado o no ramificado), un alquinilo inferior (ramificado o no ramificado), un cicloalquilo inferior y un cicloalqueno inferior. Los grupos alquilo inferior preferibles son los no cíclicos y saturados.

50 Como se utiliza aquí, el término "acilo" significa un grupo alquilo, cicloalquilo, heterocíclico, arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido unido a través de un grupo carbonilo e incluye grupos como acetilo, propionilo, benzoilo, 3-piridinilcarbonilo, 2-morfolinocarbonilo, 4-hidroxibutanoilo, 4-fluorobenzoilo, 2-naftoilo, 2-fenil-acetilo, 2-metoxiacetilo y similares.

55 Como se utiliza aquí, el término "arilo" significa un grupo aromático carbocíclico sustituido o no sustituido, como fenil o naftilo.

60 El término "heteroarilo", solo o en combinación con otros grupos, significa un radical monocíclico o bicíclico de 5 a 12 átomos en el anillo con al menos un anillo aromático que contiene uno, dos o tres heteroátomos en el anillo seleccionados de entre N, O y S, el resto de átomos del anillo son C, entendiéndose que el punto de unión del radical heteroarilo será en el anillo aromático. Uno o dos átomos de carbono del anillo del grupo heteroarilo pueden reemplazarse con un grupo carbonilo.

65 Los grupos alquilo, arilo y heteroarilo pueden ser sustituidos o no sustituidos. Si son sustituidos, generalmente

5 estarán presentes de 1 a 3 sustituyentes, preferiblemente 1 sustituyente. Los sustituyentes pueden incluir: grupos que contienen carbono como alquilo, arilo, arilalquilo (por ejemplo fenilo sustituido y no sustituido, bencilo sustituido y no sustituido); átomos halógenos y grupos que contienen halógenos como haloalquilo (por ejemplo trifluorometilo); grupos que contienen oxígeno como alcoholes (por ejemplo hidroxilo, hidroxialquilo, aril(hidroxil)alquilo), alcoxi, ariloxi, alcoxialquilo, ariloxialquilo, acilo, ácidos (por ejemplo carboxi, carboxialquilo), derivados de ácidos como ésteres (por ejemplo alcoxycarbonilo, alcoxycarbonilalquilo, alquilocarboniloxi, alquilocarbonilalquilo), amidas (por ejemplo aminocarbonilo, mono- o di-alquiloaminocarbonilo, aminocarbonilalquilo, mono- o di-alquiloaminocarbonilalquilo, arilaminocarbonilo), carbamatos (por ejemplo alcoxycarbonilamino, arloxycarbonilamino, aminocarboniloxi, mono- o di-alquiloamino-carboniloxi, arilaminocarboniloxi) y ureas (por ejemplo mono- o di-alquiloaminocarbonilamino o arilaminocarbonilamino); grupos que contienen nitrógeno como aminas (por ejemplo amino, mono- o di-alquiloamino, aminoalquilo, mono- o di-alquiloaminoalquilo), azidas, nitrilos (por ejemplo ciano, cianoalquilo), nitro; grupos que contienen azufre como tioles, tioéteres, sulfóxidos y sulfonas (por ejemplo tioalquilo, alquilosulfonilo, alquilosulfonilalquilo, alquilosulfonilalquilo, alquilosulfonilalquilo, tioarilo, arilsulfonilo, tioariloalquilo, arilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo); y grupos heterocíclicos que contienen uno o más, preferiblemente uno, heteroátomos, (por ejemplo tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, aziridinilo, azetidino, pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, tetrahidrofuranilo, piranilo, pironilo, piridilo, pirazinilo, piridazinilo, piperidilo, hexahidroazepinilo, peperazinilo, morfolinilo, tianaftilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, indolilo, oxiindolilo, isoindolilo, indazolilo, indolinilo, 7-azaindolilo, benzopirano, cumarinilo, isocumarinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, naftidinilo, cinolinilo, quinazolinilo, piridopiridilo, benzoxazinilo, quinoxalinilo, cromenilo, cromanilo, isocromanilo, ftalazinilo y carbolinilo).

Los grupos alquilo inferiores pueden ser sustituidos o no sustituidos, preferiblemente no sustituidos. Si son sustituidos, generalmente habrá presentes de 1 a 3 sustituyentes, preferiblemente 1 sustituyente. Los sustituyentes incluyen los grupos de sustituyentes listados anteriormente diferentes de alquilo, arilo y arilalquilo.

Como se utiliza aquí, el término "alcoxi" significa alquil-O- y "alcanoilo" significa alquil-CO-. Los grupos sustituyentes alcoxi o los grupos sustituyentes que contienen alcoxi pueden ser sustituidos por uno o más grupos alquilo.

Como se utiliza aquí, el término "halógeno" significa un radical flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente un radical flúor, cloro o bromo, y más preferiblemente un radical flúor o cloro.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales de adición ácida convencionales o las sales de adición básica que retienen la efectividad y propiedades biológicas de los compuestos de fórmula I y se forman a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos, o bases orgánicas o inorgánicas, no tóxicos adecuados. Ejemplos de sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas a partir de ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico, y aquellas derivadas a partir de ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico y similares. Ejemplos de sales de adición básica incluyen aquellas derivadas a partir de hidróxidos de amonio, potasio, sodio y amonio cuaternario, como por ejemplo, hidróxido de tetrametilamonio. La modificación química de un compuesto farmacéutico (es decir un fármaco) a una sal es una técnica bien conocida que se utiliza en un intento de mejorar las propiedades relacionadas con la estabilidad física o química, por ejemplo, la higroscopicidad, fluidez o solubilidad de los compuestos. Véase, por ejemplo, H. Ansel *et. al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6ª Ed. 1995) en las págs. 196 y 1456-1457.

Un "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a un compuesto de fórmula I con un grupo carboxilo esterificado de forma convencional, cuyo éster puede mantener la efectividad y las propiedades biológicas de los compuestos de fórmula I y son escindidos *in vivo* (en el organismo) en el correspondiente ácido carboxílico activo. Ejemplos de grupos éster que se escinden (en este caso se hidrolizan) *in vivo* en los correspondientes ácidos carboxílicos son aquellos en los que el hidrógeno escindido se reemplaza con un alquilo inferior que está opcionalmente sustituido, por ejemplo, con un heterociclo, cicloalquilo, etc. Ejemplos de ésteres de alquilo inferior sustituido son aquellos en los que el alquilo inferior es sustituido con pirrolidina, piperidina, morfolina, N-metilpiperazina, etc. El grupo que se escinde *in vivo* puede ser, por ejemplo, etilo, morfolino etilo y dietilamino etilo. En relación con la presente invención, -CONH<sub>2</sub> también se considera un éster, ya que -NH<sub>2</sub> se escinde *in vivo* y se reemplaza con un grupo hidroxilo, para formar el correspondiente ácido carboxílico.

El término "Tyr-modificada" se refiere a una tirosina que está modificada de cualquier modo, preferiblemente por sustitución con de 1 a 3, preferiblemente de 1 a 2 sustituyentes, independientemente seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior y halógeno. Las Tyr-modificadas preferibles son la metil-tirosina, preferiblemente C-alfa-metil-tirosina (C-alfa-Me-Tyr), 3-yodo-tirosina ((3-I)Y), 3,5-difluoro-tirosina ((3,5 di F)Y), 2,6-difluoro-tirosina ((2,6 di F)Y) y 2,6-dimetil-tirosina ((2,6 di Me)Y). Otra Tyr-modificada preferible es la meta-tirosina ((m)-Y). Las Tyr-modificadas particularmente preferibles son las que aparecen en los ejemplos específicos a continuación.

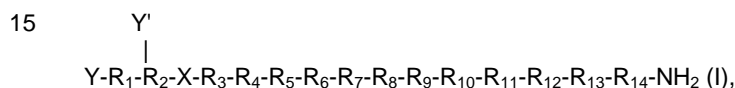
El término "Phe-modificada" se refiere a una fenilalanina que está modificada de cualquier modo, preferiblemente por sustitución con de 1 a 4 sustituyentes independientemente seleccionados de entre el grupo que consiste en alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, fluoroalquilo inferior, alcoxi inferior, amino y halógeno. Las Phe-modificadas

preferibles son la 4-metoxi-fenilalanina (F(4-O-CH<sub>3</sub>)), 4-amino-fenilalanina ((4-NH<sub>2</sub>)Phe), 4-fluoro-fenilalanina ((4-F)Phe), 4-hidroxi-metil-fenilalanina ((4-CH<sub>2</sub>OH)Phe), 4-trifluorometil-fenilalanina ((4-CF<sub>3</sub>)Phe), 3-fluoro-fenilalanina ((3-F)Phe), 2,3,4,5,6-pentafluoro-fenilalanina ((2,3,4,5,6-penta-F)Phe) y 3,4-dicloro-fenilalanina ((3,4 di-Cl)Phe). Las Phe-modificadas particularmente preferibles son las que aparecen en los ejemplos específicos a continuación.

5 El término "hidroxi-alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo inferior como se ha definido anteriormente, que está sustituido con un grupo hidroxilo, preferiblemente hidroximetil.

10 El término "fluoro-alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo inferior como se ha definido anteriormente que está monosustituido o sustituido de forma múltiple con flúor. Ejemplos de grupos fluoro-alquilo inferior son por ejemplo CFH<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>H, CF<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH y CF<sub>2</sub>H-CF<sub>2</sub>, preferiblemente CF<sub>3</sub>.

En detalle, la presente invención concierne a un agonista del receptor del neuropéptido-2 de fórmula (I):

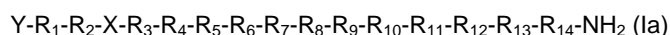


en donde:

20 X es ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolina-acético (Pqa),  
 Y es H, una porción acilo, un alquilo sustituido o no sustituido, un alquilo inferior sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alcoxi sustituido o no sustituido, una porción poli(etilen)glicol, PEG<sub>m</sub>-SSA, PEG<sub>m</sub>-β-SBA, PEG<sub>m</sub>-SPA o PEG<sub>m</sub>-BTC,  
 25 Y' es H, una porción poli(etilen)glicol, PEG<sub>m</sub>-SSA, PEG<sub>m</sub>-β-SBA, PEG<sub>m</sub>-SPA o PEG<sub>m</sub>-BTC,  
 R<sub>1</sub> es Ile, Ala, (D) Ile, N-metil Ile, Aib, 1-1Aic, 2-2 Aic, Ach o Acp,  
 R<sub>2</sub> es Lys, Ala, (D) Lys, NMelys, Nle o (Lys-Gly),  
 R<sub>3</sub> es Arg, Ala, (D)Arg, N-metil Arg, Phe, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>4</sub> es His, Ala, (D)His, N-metil His, 4-MeOApC, 3-Pal o 4-Pal,  
 30 R<sub>5</sub> es Tyr, Ala, (D)Tyr, N-metil Tyr, Trp, Tic, Bip, Dip, (1)Nal, (2)Nal, 3,4,5-Trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>6</sub> es Leu, Ala, (D)Leu o N-metil Leu,  
 R<sub>7</sub> es Asn, Ala o (D)Asn,  
 R<sub>8</sub> es Leu o Trp,  
 R<sub>9</sub> es Val, Ala, (D)Val o N-metil Val,  
 35 R<sub>10</sub> es Thr, Ala o N-metil Thr,  
 R<sub>11</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>12</sub> es Gln o Ala,  
 R<sub>13</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>14</sub> es Tyr, (D)Tyr o N-metil Tyr, Tyr-modificada, Phe, Phe-modificada, Cha, (1)Nal, (2)Nal, C-alfa-metil Tyr o Trp, y  
 40 PEG<sub>m</sub> tiene de 1 a 60 KDa,  
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de fórmula (I) son individualmente preferibles y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son individualmente preferibles, siendo particularmente preferibles los compuestos de fórmula (I).

Los agonistas del receptor del neuropéptido-2 preferibles como se han descrito anteriormente son aquellos que se caracterizan por la fórmula (Ia)



en la que:

X es ácido N-piperazin-1-il-4(3H)-quinazolinona-3-acético (Pqa),  
 Y es H, una porción acilo, un alquilo sustituido o no sustituido, un alquilo inferior sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alcoxi sustituido o no sustituido, una porción poli(etilen)glicol, PEG-SSA, PEG-β-SBA,  
 55 PEG-SPA o PEG-BTC,  
 R<sub>1</sub> es Ile, Ala, (D)Ile, N-metil Ile, Aib, 1-1Aic, 2-2 Aic, Ach o Acp,  
 R<sub>2</sub> es Lys, Ala, (D)Lys, NMelys, Nle o (Lys-Gly),  
 R<sub>3</sub> es Arg, Ala, (D)Arg, N-metilArg, Phe, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>4</sub> es His, Ala, (D)His, N-metil His, 4-MeOApC, 3-Pal o 4-Pal,  
 60 R<sub>5</sub> es Tyr, Ala, (D)Tyr, N-metil Tyr, Trp, Tic, Bip, Dip, (1)Nal, (2)Nal, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>6</sub> es Leu, Ala, (D)Leu o N-metil Leu,  
 R<sub>7</sub> es Asn, Ala o (D)Asn,  
 R<sub>8</sub> es Leu o Trp,  
 R<sub>9</sub> es Val, Ala, (D)Val o N-metil Val,  
 65 R<sub>10</sub> es Thr, Ala o N-metil Thr,  
 R<sub>11</sub> es Arg, (D) Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>12</sub> es Gln o Ala,

R<sub>13</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg, y  
 R<sub>14</sub> es Tyr, (D)Tyr o N- metil Tyr, Tyr-modificada, Phe, Phe-modificada o Trp,  
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 Una realización preferible de la presente invención está relacionada con un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente, en el que R<sub>2</sub> está sustituido con Y', e Y' es H, una porción poli(etilen)-glicol, PEG<sub>m</sub>-SSA, PEG<sub>m</sub>-β-SBA, PEG<sub>m</sub>-SPA o PEG<sub>m</sub>-BTC. Más preferiblemente, Y' es una porción poli(etilen)glicol, PEG<sub>m</sub>-SSA, PEG<sub>m</sub>-β-SBA, PEG<sub>m</sub>-SPA o PEG<sub>m</sub>-BTC.

10 Otra realización preferible de la presente invención está relacionada con un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente, en el que:  
 Y es H o una porción acilo, e  
 Y' es una porción poli(etilen)glicol, PEG<sub>m</sub>-SSA, PEG<sub>m</sub>-β-SBA, PEG<sub>m</sub>-SPA o PEG<sub>m</sub>-BTC. Más preferiblemente, Y' es PEG<sub>m</sub>-SSA o PEG<sub>m</sub>-SPA.

15 Preferiblemente, Y es una porción acilo. En otra realización preferible, Y puede ser H. Además, es preferible que Y' pueda ser H.

20 En el agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente, es preferible que el PEG<sub>m</sub> tenga de 20 a 40 KDa. Preferiblemente, el PEG<sub>m</sub> tiene 30 KDa. Preferiblemente, una porción poli(etilen)glicol tiene un peso de entre 1 y 60 KDa, más preferiblemente de 20 a 40 KDa, y más preferiblemente 30KDa.

25 En el agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente, es preferible que R<sub>1</sub> sea Ile. Además, es preferible que R<sub>2</sub> sea Lys o Nle. Además, es preferible que R<sub>3</sub> sea Arg. Además, es preferible que R<sub>4</sub> sea His. Además, es preferible que R<sub>5</sub> sea Tyr. Además, es preferible que R<sub>6</sub> sea Leu. Además, es preferible que R<sub>7</sub> sea Asn. Además, es preferible que R<sub>8</sub> sea Leu o Trp. Además, es preferible que R<sub>9</sub> sea Val. Además, es preferible que R<sub>10</sub> sea Thr. Además, es preferible que R<sub>11</sub> sea Arg. Además, es preferible que R<sub>12</sub> sea Gln. Además, es preferible que R<sub>13</sub> sea Arg o (N-metil)Arg.

30 Además, es preferible que R<sub>14</sub> sea Tyr, (D)Tyr o N-metil Tyr, Tyr-modificada, Phe, Phe-modificada o Trp. Preferiblemente, R<sub>14</sub> es Y, (m-)Y, (3-I)Y, (3,5 di F)Y, (2,6 di F)Y, (2,6 di Me)Y, F(4-O-CH<sub>3</sub>), F, (4-NH<sub>2</sub>)Phe, (4-F)Phe, (4-CH<sub>2</sub>OH)Phe, (4-CF<sub>3</sub>)Phe, (3-F)Phe, (2,3,4,5,6-penta F)Phe, (3,4 di Cl)Phe, Cha, W, (1)Nal, (2)Nal o C-alfa-Me-Tyr. Más preferiblemente, R<sub>14</sub> es Tyr o (2,6 di F)Tyr.

35 Preferiblemente, los agonistas del receptor del neuropéptido-2 como se han descrito anteriormente, son aquellos seleccionados de entre el grupo que consiste en:

- IK-Pqa-RHYLNLVTRQRY,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- 40 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(m-)Y,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3-I)Y,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3,5 di F)Y,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2,6 di F)Y,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2,6 di Me)Y,
- 45 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RF(4-O-CH<sub>3</sub>),
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RF,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-NH<sub>2</sub>)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-F)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-CH<sub>2</sub>OH)Phe,
- 50 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-CF<sub>3</sub>)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3-F)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2,3,4,5,6-penta F)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3,4-di Cl)Phe,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RCha,
- 55 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RW,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(1)Nal,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal,
- IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal,
- 60 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal,
- INle-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- Ac-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2,6-di F)Y,
- Ac-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- Pentil-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- Trimetilacetil-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- 65 Ciclohexil-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- Benzoil-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,
- Adamantil-IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,



(PEG 30.000 SPA)IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 40.000 BTC)-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 30.000)-SSA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 30.000)-beta-SBA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 5 Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SPA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY, y  
 IK(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 Los compuestos como se ha descrito anteriormente, que no sean sales farmacéuticamente aceptables, son preferibles. Cada uno de los compuestos individuales mencionados anteriormente constituyen por separado una realización preferible.

15 Un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)R (2-6 di F)Y.

Otro agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.

20 Otro agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista (PEG 30.000)-SPA-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.

Otro agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista (PEG 30.000)-SSA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.

Otro agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil) RY.

30 Otro agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente particularmente preferible es el agonista H-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil) RY.

Los agonistas del receptor del neuropéptido-2 como se han descrito anteriormente, que no están pegilados, es decir en los que tanto Y como Y' no son una porción poli(etilen)glicol, PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC, también pueden utilizarse como intermediarios para la preparación de compuestos, en los que uno o ambas Y e Y' sean una porción poli(etilen)glicol, PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC. Tales grupos Y e Y' pueden introducirse mediante métodos estándar bien conocidos para el experto en la materia.

Preferiblemente, un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha descrito anteriormente no se selecciona de entre el grupo que consiste en:

IK-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 Ac-IK-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 45 IK-Pqa-RHYLNLVTRARY,  
 IK-Pqa-RHYLNLVARQRY,  
 IK-Pqa-RHYLNLATRQRY,  
 IK-Pqa-RHYLALVTRQRY,  
 IK-Pqa-RHYANLVTRQRY,  
 IK-Pqa-RHALNLVTRQRY,  
 50 IK-Pqa-RAYLNLVTRQRY,  
 IK-Pqa-AHYLNLVTRQRY,  
 IA-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 Ac-IA-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 AK-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 55 IK-Pqa-RHYLNLVTRQR(D)Y,  
 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(D)RY,  
 IK-Pqa-RHYLNLVT(D)RQRY,  
 IK-Pqa-RHYLNL(D)VTRQRY,  
 IK-Pqa-RHYL(D)NLVTRQRY,  
 60 IK-Pqa-RHY(D)LNLVTRQRY,  
 IK-Pqa-RH(D)YLNLVTRQRY,  
 IK-Pqa-R(D)HYLNLVTRQRY,  
 IK-Pqa-(D)RHYLNLVTRQRY,  
 I(D)K-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 65 (D)IK-Pqa-RHYLNLVTRQRY,  
 IK-Pqa-RHYLNLVTRQR(N-metil)Y,  
 IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY,

IK-Pqa-RHYLNLVT(N-metil)RQRQY,  
 IK-Pqa-RHYLNLV(N-metil)TRQRQY,  
 IK-Pqa-RHYLNL(N-metil)VTRQRQY,  
 IK-Pqa-RHY(N-metil)LNLVTRQRQY,  
 5 IK-Pqa-RH(N-metil)YLNLVTRQRQY,  
 IK-Pqa-R(N-metil)HYLNLVTRQRQY,  
 IK-Pqa-(N-metil)RHYLNLVTRQRQY,  
 I(N-metil)K-Pqa-RHYLNLVTRQRQY,  
 (N-metil)IK-Pqa-RHYLNLVTRQRQY,  
 10 INle-Pqa-RHYLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RHYLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-FHYLNLVTRQRQY,  
 IK-Pqa-RHWLNLVTRQRQY,  
 IK-Pqa-AHWLNLVTRQRQY,  
 15 Ac-INle-Pqa-RHYLNLVTRQR(D)Y,  
 Ac-INle-Pqa-RHYLNLVTRQR(N-metil)Y,  
 Ac-INle-Pqa-RHTicLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RHBipLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RHDipLNLVTRQRQY,  
 20 Ac-INle-Pqa-RH(1)NaLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RH(2)NaLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RH(3,4,5-trifluoro Phe)LNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-RH(2,3,4,5,6-pentafluoro Phe)LNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-R(4-MeOApC)YLNLVTRQRQY,  
 25 Ac-INle-Pqa-R(3-Pal)YLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-R(4-Pal)YLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-(3,4,5-trifluoro Phe)HYLNLVTRQRQY,  
 Ac-INle-Pqa-(2,3,4,5,6-pentafluoro Phe)HYLNLVTRQRQY,  
 Ac-Aib-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 30 Ac1-1-Aic-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 Ac1-1-Aic-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 Ac-2-2Aic-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 Ac-Ach-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 Ac-Acp-Nle-Pqa-RHYLNLVTRQRQRT,  
 35 H-INle-Pqa-RHYLNLVTRQRQY,  
 (PEG-10.000) INle-Pqa-RHYLNLVTRQRQY y  
 (PEG-30.000) INle-Pqa-RHYLNLVTRQRQY.

40 Los compuestos de la invención son ventajosos porque, por ejemplo, son versiones truncadas del PYY3-36. Los péptidos más cortos, por ejemplo, no sólo permiten que la síntesis y la purificación de los compuestos sea más sencilla, sino que también mejoran y reducen los procedimientos y costes de la elaboración. Además, los compuestos de la invención interaccionarán preferiblemente con los receptores Y2 y no con los receptores homólogos como NPY Y1, Y4 y Y5. Por lo tanto, las reacciones colaterales agonísticas o antagonísticas no deseadas se minimizan.

45 Los compuestos de la invención son preferiblemente útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos metabólicos. Tales enfermedades y trastornos metabólicos incluyen, por ejemplo, la obesidad, diabetes, preferiblemente diabetes tipo 2, síndrome metabólico (también conocido como síndrome X), resistencia a la insulina, dislipidemia, desajustes de glucosa en ayunas y problemas de tolerancia a la glucosa.

50 Por lo tanto, la invención también se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha definido anteriormente, y un transportador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

55 Asimismo, la invención comprende la utilización de los agonistas del receptor del neuropéptido-2 como se han descrito anteriormente como sustancias terapéuticamente activas, especialmente como sustancias terapéuticamente activas para el tratamiento y/o profilaxis de la obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia, desajustes de glucosa en ayunas y problemas de tolerancia a la glucosa.

60 La invención se refiere también a la utilización del agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha descrito anteriormente para la elaboración de medicamentos para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia, desajustes de glucosa en ayunas y problemas de tolerancia a la glucosa. Tales medicamentos incluyen un agonista del receptor del neuropéptido-2 como se ha descrito anteriormente.

65 Debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones particulares de la invención descritas aquí, ya que pueden realizarse variaciones de las realizaciones particulares y continuar dentro del alcance de las

reivindicaciones anexas. También debe entenderse que la terminología se utiliza con el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. Sin embargo, el alcance de la presente invención se establecerá en las reivindicaciones anexas.

- 5 Puede encontrarse más información concerniente a los ejemplos y la utilización de ésteres para la liberación de compuestos farmacéuticos en Design of Prodrugs. Bundgaard H. ed. (Elsevier, 1985). Véase también, H. Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (6ª Ed. 1995) en las págs. 108-109; Krogsgaard-Larsen, *et al.*, Textbook of Drug Design and Development (2ª Ed. 1996) en las págs. 152-191
- 10 Los presentes compuestos representativos pueden sintetizarse correctamente mediante cualquier procedimiento convencional conocido para la formación de una unión peptídica entre aminoácidos. Tales procedimientos convencionales incluyen, por ejemplo, cualquier procedimiento en fase soluble que permita una condensación entre el grupo amino alfa libre de un aminoácido o residuo del mismo que tiene protegidos su grupo carboxilo y otros grupos reactivos, y el grupo carboxilo primario libre de otro aminoácido o residuo del mismo que tiene protegidos su
- 15 grupo amino y otros grupos reactivos.
- Estos procedimientos convencionales para la síntesis de los nuevos compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, cualquier método de síntesis de péptidos en fase sólida. En tales métodos, la síntesis de los nuevos compuestos puede realizarse mediante la incorporación secuencial de los residuos de aminoácido deseados, uno a uno, en la cadena peptídica creciente de acuerdo con los principios generales de los métodos en fase sólida. Tales métodos se describen en, por ejemplo, Merrifield, R. B., J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); Barany *et al.*, The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology, Vol. 2, Gross, E. y Meienhofer, J., Editores. Academic Press 1-284 (1980), que se incorporan aquí como referencia.
- 20
- 25 Es común en la síntesis química de péptidos la protección de grupos reactivos de cadenas laterales de las diferentes porciones de aminoácido con grupos protectores adecuados, lo que previene que ocurra una reacción química en ese lugar hasta que el grupo protector es finalmente eliminado. A menudo también se utiliza la protección del grupo amino alfa en un aminoácido o un fragmento mientras esta entidad reacciona en el grupo carboxilo, seguido de una eliminación selectiva del grupo protector en el amino alfa que permita que se de la
- 30 reacción subsiguiente en ese punto. Aunque los grupos protectores específicos se han descrito en referencia al método de síntesis en fase sólida, debe notarse que cada aminoácido puede protegerse mediante el grupo protector utilizado convencionalmente en cada uno de los respectivos aminoácidos en una síntesis en fase soluble.
- Los grupos amino alfa pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre los grupos protectores tipo uretano aromáticos, como aliloxicarbonilo, benciloxicarbonilo (Z) y benciloxicarbonilo sustituido, como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-bifenil-isopropiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y p-metoxibencil-oxicarbonilo (Moz); grupos protectores tipo uretano alifáticos, como t-butiloxicarbonilo (Boc), diisopropilmetiloxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, y aliloxicarbonilo. Aquí, Fmoc es el grupo más preferible para la protección del amino alfa.
- 35
- 40 Los grupos guanidino pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre nitro, p-toluensulfonilo (Tos), (Z,)pentametilmocromansulfonilo (Pmc) y 4-metoxi-2,3,6-trimetilbensulfonilo (Mtr), siendo los más preferibles para la arginina (Arg), (Pmc) y (Mtr).
- 45 Los grupos amino  $\epsilon$  pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre 2-clorobencil-oxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z) y t-butiloxicarbonilo (Boc). El Boc es el más preferible para la (Lys).
- Los grupos hidroxilo (OH) pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre bencilo (Bzl), 2,6-diclorobencilo (2,6 diCl-Bzl), y terc-butilo (t-Bu), siendo el (tBu) el más preferible para la (Tyr), (Ser) y (Thr).
- 50
- Los grupos amida  $\beta$  y  $\gamma$  pueden protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre 4-metiltrilito (Mtt), 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob), 4,4-dimetoxiditilBis-(4-metoxifenil)-metilo (Dod) y trilito (Trt). El Trt es el más preferible para la (Asn) y (Gln).
- 55
- El grupo indol puede protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre formil (For), mesitil-2-sulfonilo (Mts) y t-butiloxicarbonilo (Boc). El Boc es el más preferible para el (Trp).
- 60
- El grupo imidazol puede protegerse mediante un grupo protector adecuado seleccionado de entre bencilo (Bzl), -t-butiloxicarbonilo (Boc), y trilito (Trt). El Trt es el más preferible para la (His).
- La síntesis del aminoácido Pqa se describe en J. Hutchinson *et al* (J .Med. Chem. 1996, 39, 4583-4591). El derivado Fmoc-Pqa se adquirió de NeoMPS, Inc. (San Diego CA)
- 65
- Todos los solventes, isopropanol (iPrOH), cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), dimetilformamida (DMF) y N-metilpirrolinona (NMP), se adquirieron de Fisher o Burdick & Jackson y se utilizaron sin una destilación adicional. El

ácido trifluoroacético se adquirió de Halocarbon o Fluka y se utilizó sin una posterior purificación.

La diisopropilcarbodiimida (DIC) y diisopropiletilamina (DIPEA) se adquirieron de Fluka o Aldrich y se utilizaron sin una posterior purificación. El dimetilsulfuro (DMS) de hidroxibenzotriazol (HOBT) y 1,2-etanoditiol (EDT) se adquirieron de Sigma Chemical Co. y se utilizaron sin una posterior purificación. Los aminoácidos protegidos normalmente están en configuración L y se obtuvieron comercialmente de Bachem o Neosystem. La pureza de estos reactivos se confirmó mediante cromatografía en capa fina, NMR y punto de fusión previamente a su uso. La resina de benzhidrilamina (BHA) es un copolímero de estireno-divinilbenceno al 1% (100-200 o 200-400 de malla) obtenidos de Bachem o Advanced Chemtech. El contenido total de nitrógeno de estas resinas está generalmente entre 0,3-1,2 meq/g.

En una realización preferible, los péptidos se obtuvieron utilizando síntesis en fase sólida mediante el método descrito generalmente por Merrifield, (J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)), aunque como se ha mencionado previamente pueden utilizarse otras síntesis químicas equivalentes conocidas en la materia. La síntesis en fase sólida se inicia desde el extremo C-terminal del péptido mediante el acoplamiento de un aminoácido alfa protegido a una resina adecuada. Tal material de partida puede prepararse mediante la unión de un aminoácido con el amino-alfa protegido por un enlace éster a una resina de p-benciloxibencil alcohol (Wang), o por un enlace amida entre un enlazante Fmoc, como el ácido p-((R,S)- $\alpha$ -(1-(9H-fluoren-9-il)-metoxi-formamida)-2,4-dimetiloxibencil)-fenoxiacético (enlazante Rink) a una resina de benzhidrilamina (BHA). La preparación de la resina de hidroximetilo es bien conocida en la materia. Los soportes de resina de enlazante Fmoc-BHA están disponibles comercialmente y son generalmente utilizados cuando el péptido deseado a sintetizar tiene una amida no sustituida en el extremo C-terminal.

Típicamente, los aminoácidos o miméticos se acoplan en la resina de enlazante Fmoc-BHA utilizando la forma del aminoácido o mimético protegida con Fmoc, con 2-5 equivalentes de aminoácido y un reactivo de acoplamiento adecuado. Tras los acoplamientos, la resina puede lavarse y secarse al vacío. La carga de aminoácidos en la resina puede determinarse mediante un análisis del aminoácido de una alícuota de resina de aminoácido-Fmoc o por determinación de grupos Fmoc mediante un análisis de UV. Cualquier grupo amino que no haya reaccionado puede taparse haciendo reaccionar la resina con anhídrido acético y diisopropiletilamina en cloruro de metileno.

Las resinas se someten a varios ciclos repetitivos para añadir los aminoácidos secuencialmente. Los grupos protectores Fmoc de amino alfa se eliminan en condiciones básicas. Para este propósito pueden utilizarse piperidina, piperazina o morfolina (al 20-40% v/v) en DMF. Preferiblemente se utiliza piperidina al 40% en DMF.

Tras la eliminación del grupo protector del amino alfa, los subsiguientes aminoácidos protegidos se acoplan paso a paso en el orden deseado para obtener un intermediario, resina-péptido protegido. Los reactivos activadores utilizados para el acoplamiento de los aminoácidos en la síntesis en fase sólida de los péptidos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, los reactivos apropiados para tales síntesis son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri-(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y diisopropilcarbodiimida (DIC). Los preferidos aquí son HBTU y DIC. Otros agentes activadores se describen en Barany y Merrifield (en The Peptides, Vol. 2, J. Meienhofer, ed., Academic Press, 1979, págs. 1-284) y pueden utilizarse. Varios reactivos como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), N-hidroxisuccinimida (HOSu) y 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOBT) pueden añadirse a las mezclas de acoplamiento para optimizar los ciclos sintéticos. El preferido aquí es HOBT.

Para la preparación de derivados acetilo en N-terminal, se llevó a cabo una acetilación mediante el tratamiento del péptido unido a la resina con anhídrido acético al 20% en DMF con DIEA al 5%. Para otras acilaciones en N-terminal, se llevó a cabo una acilación utilizando el correspondiente ácido carboxílico activado *in situ* con DIC/HOBT durante 30 minutos.

El protocolo de un ciclo sintético típico es el siguiente:

#### Protocolo 1

Paso	Reactivo	Tiempo
1	DMF	2 x 30 s.
2	piperidina al 20%/ DMF	1 min.
3	piperidina al 20%/ DMF	15 min.
4	DMF	2 x 30 s.
5	iPrOH	2 x 30 s.
6	DMF	3 x 30 s.
7	Acoplamiento	60 min-18 horas
8	DMF	2 x 30 s.
9	iPrOH	1 x 30 s.
10	DMF	1 x 30 s.
11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2 x 30 s.

Los solventes para todos los lavados y acoplamientos se midieron en volúmenes de 10-20 ml/g de resinas. Las reacciones de acoplamiento a lo largo de la síntesis se monitorizaron mediante la prueba de ninhidrina de Kaiser para determinar el alcance de la finalización (Kaiser *et al.* Anal. Biochem. 34, 595-598 (1970)). Se observó una cinética de reacción lenta para la Fmoc-Arg (Pmc) y para los acoplamientos a aminas secundarias de los ácidos estéricamente obstaculizados. Cualquier reacción de acoplamiento incompleto se reemplazó con aminoácido activado recién preparado o se bloqueó mediante el tratamiento de la resina con el péptido con anhídrido acético como se ha descrito anteriormente. Las resinas con un péptido completamente ensamblado se secaron al vacío durante varias horas.

Para la mayoría de los compuestos, los grupos de bloqueo se eliminaron y el péptido se escindió de la resina. Por ejemplo, las resinas-péptido se trataron con 100  $\mu$ L de etanoditiol, 100  $\mu$ L de dimetilsulfuro, 300  $\mu$ L de anisol y 9,5 mL de ácido trifluoroacético, por gramo de resina, a temperatura ambiente durante 180 min., o alternativamente las resinas-péptido se trataron con 1,0 mL de triisopropilsilano y 9,5 mL ácido trifluoroacético, por gramo de resina, a temperatura ambiente durante 180 min. La resina se eliminó por filtración y los filtrados se precipitaron en éter de etilo helado. Los precipitados se centrifugaron y la capa de éter se decantó. El residuo se lavó con dos o tres volúmenes de Et<sub>2</sub>O y se recentrifugó. Los productos crudos se secaron al vacío.

La purificación de los péptidos crudos se realizó preferiblemente en un sistema Shimadzu LC-8A de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna C-18 de fase reversa (50 x 250 mm. 300 A, 10-15  $\mu$ m). Los péptidos se inyectaron en las columnas en un volumen mínimo de AcOH al 0,1%/H<sub>2</sub>O o de CH<sub>3</sub>CH/H<sub>2</sub>O. La elución en gradiente se inició generalmente con tampón B al 2%, B al 2%-70% a lo largo de 70 minutos, (tampón A: TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O, tampón B: TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN) a una tasa de flujo de 50 ml/min. La detección por UV se realizó a 220/280 nm. Las fracciones que contienen los productos se separaron y se analizó su pureza en un sistema analítico Shimadzu LC-10AT utilizando una columna Ace C18 de fase reversa (4,6 x 50mm) a una tasa de flujo de 2 ml/min. y un gradiente (del 2-70%) a lo largo de 10 min. (tampón A: TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O, tampón B: TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN)). Las fracciones que se determinó eran de una elevada pureza se agruparon y liofilizaron.

La pureza de los productos finales se comprobó mediante HPLC analítico en una columna de fase reversa como se ha indicado anteriormente. La pureza de todos los productos se calculó era aproximadamente del 95-99%. Todos los productos finales también se sometieron a una espectrometría de masas de bombardeo de átomos rápidos (FAB-MS) o espectrometría de masas de electropulverización (ES-MS). Todos los productos rindieron los iones M+H originales esperados dentro de límites aceptables.

Los compuestos de la presente invención pueden proporcionarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de las sales preferibles son aquellas formadas con ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, el ácido acético, láctico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, salicílico, metanosulfónico, toluenosulfónico, trifluoro-acético o pamoico, así como con ácidos poliméricos como el ácido tánico o la carboximetilcelulosa, y las sales con ácidos inorgánicos, como los hidrácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico), ácido sulfúrico o ácido fosfórico y similares. Puede utilizarse cualquier procedimiento para obtener una sal farmacéuticamente aceptable conocido para el experto en la materia.

En la práctica del método de la presente invención, una cantidad efectiva de cualquiera de los péptidos de esta invención o una combinación de cualquiera de los péptidos de esta invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, se administra a través de cualquiera de los métodos usuales y aceptables conocidos en la materia, bien en solitario o en combinación. La administración puede ser, por ejemplo, una vez al día, una vez cada tres días o una vez a la semana. Los compuestos o composiciones por tanto pueden administrarse por vía oral (por ejemplo, la cavidad bucal), sublingual, parenteral (por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea), rectal (por ejemplo, mediante supositorios o lavados), transdérmica (por ejemplo, electroporación en la piel) o por inhalación (por ejemplo, mediante un aerosol), y en forma de dosis sólidas, líquidas o gaseosas, lo que incluye comprimidos y suspensiones. La administración puede realizarse en forma de una única dosis con una terapia continua o en una terapia de dosis única *ad libitum*. La composición terapéutica también puede estar en forma de una emulsión o dispersión oleosa en conjunción con una sal lipofílica como el ácido pamoico, o en forma de una composición de liberación sostenida biodegradable para su administración subcutánea o intramuscular.

Por lo tanto, el método de la presente invención se lleva a la práctica cuando el alivio de los síntomas es especialmente necesario o quizás inminente. Alternativamente, el método de la presente invención se lleva a la práctica efectivamente como un tratamiento continuo o profiláctico.

Los transportadores farmacéuticos útiles para la preparación de estas composiciones, pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos; por lo tanto, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, supositorios, polvos, formulaciones protegidas entéricamente con un recubrimiento u otros (por ejemplo la unión a resinas de intercambio iónico o el empaquetamiento en vesículas de lípido-proteína), formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles, y similares. El transportador puede seleccionarse de entre los diferentes aceites que incluyen los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, el aceite de

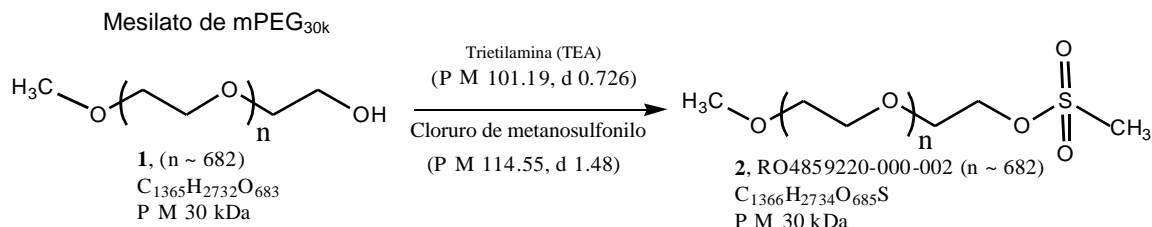
cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los transportadores líquidos preferibles son el agua, salina, dextrosa acuosa y glicoles, en particular (si son isotónicos con la sangre) para las soluciones inyectables. Por ejemplo, las formulaciones para la administración intravenosa comprenden soluciones acuosas estériles del(de los) ingrediente(s) activo(s) que se preparan disolviendo el(los) ingrediente(s) activo(s) sólido(s) en agua para dar lugar a una solución acuosa, y producir una solución estéril. Los excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, talco, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, sílice, estearato magnésico, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. A las composiciones pueden añadirse aditivos farmacéuticos convencionales como conservantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes o emulsificantes, sales para el ajuste de la presión osmótica, tampones y similares. Los transportadores farmacéuticamente adecuados y su formulación se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán, en cualquier caso, una cantidad efectiva del compuesto activo junto con un transportador adecuado para preparar la forma de dosificación apropiada para la correcta administración en el recipiente.

La dosis de un compuesto de la presente invención depende de una serie de factores, como, por ejemplo, la forma de administración, la edad y el peso corporal del sujeto, y la condición del sujeto a tratar, y la decidirá en último término el médico o veterinario asistente. Dicha cantidad de compuesto activo determinada por el médico o veterinario asistente se denomina aquí, y en las reivindicaciones, "cantidad efectiva". Por ejemplo, la dosis para la administración intranasal está normalmente en el rango de entre alrededor de 0,001 a alrededor de 0,1 mg/kg de peso corporal. En humanos, la dosis subcutánea preferible en base al contenido de péptido es de entre alrededor de 0,001 mg a alrededor de 100 mg; preferiblemente de entre alrededor de 0,1 mg a alrededor de 15 mg. Para el API, oscilará de entre alrededor de 0,015 mg a alrededor de 100 mg; preferiblemente de entre alrededor de 1 mg a alrededor de 100 mg.

La invención se describirá ahora en más detalle en los Ejemplos a continuación, que pretenden ser sólo una ilustración y no limitan el alcance de la invención.

## EJEMPLOS

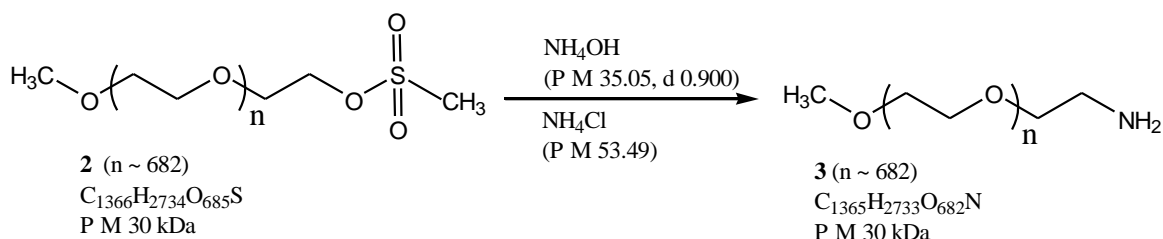
### PREPARACIÓN DE REACTIVO



Un recipiente de 1 L de fondo redondeado equipado con un agitador magnético, trampa de Dean-Stark, condensador de reflujo y burbujeador interno de argón (o nitrógeno) se llenó con 100 g (3,34 mmol) de mPEG 30 kDa (obtenido de Nippon Oil y Fat) y 500 mL de tolueno. La solución de PEG en tolueno se secó azeotrópicamente eliminando por destilación 250 mL de tolueno y entonces la solución se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadieron a la solución 200 mL de diclorometano anhidro, la solución se enfrió hasta 0-5°C y se añadieron gota a gota 0,67 mL (4,84 mmol) de trietilamina y 0,33 mL (4,34 mmol) de cloruro de metanosulfonilo utilizando una jeringa a través de un septo de goma. La mezcla se agitó durante 2 horas a ca. 4°C y entonces se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche en gas argón.

La mezcla se concentró en un evaporador rotatorio y se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado grueso para eliminar las sales. (Atención: calentar el filtro de vidrio sinterizado durante la filtración para evitar que la solución solidifique). El producto se precipitó mediante la adición de ca. 1800 ml de isopropil alcohol frío y dietil éter (30:70, v/v). El producto se recogió y se secó al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche para dar lugar a 90g (90%) de un sólido blanco.

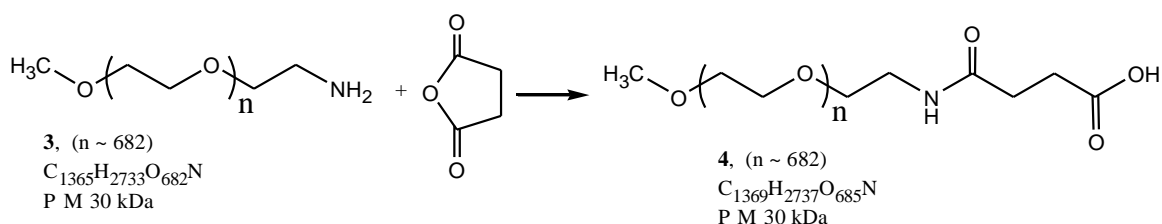
### Paso 2. Amina de mPEG<sub>30k</sub>



5 A 2-L, recipiente de fondo redondeado equipado con un agitador magnético y un burbujeador interno de argón se relleno con 90 g (3 mmol) de mesilato de mPEG 30 kDa (**2**) preparado anteriormente y 1600 mL de solución acuosa de hidróxido de amonio (al 30%, v/v). A esta solución se añadieron 160 g de cloruro de amonio. La solución se calentó cuidadosamente para disolver todo el mesilato de PEG. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 h mientras se purgaba el exceso de gases a través de un burbujeador para evitar el aumento de la presión en el recipiente de reacción.

10 Después de completar la reacción, se añadieron 160 g (10% en peso) de cloruro sódico y la mezcla se extrajo con 3 x 200 mL = 1200 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico anhidro durante alrededor de 1 h, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. El producto se precipitó mediante la adición de 1800 mL de dietil éter frío, se filtró y se secó al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche para dar lugar a 85g (94%) de (**3**) como un sólido blanco.

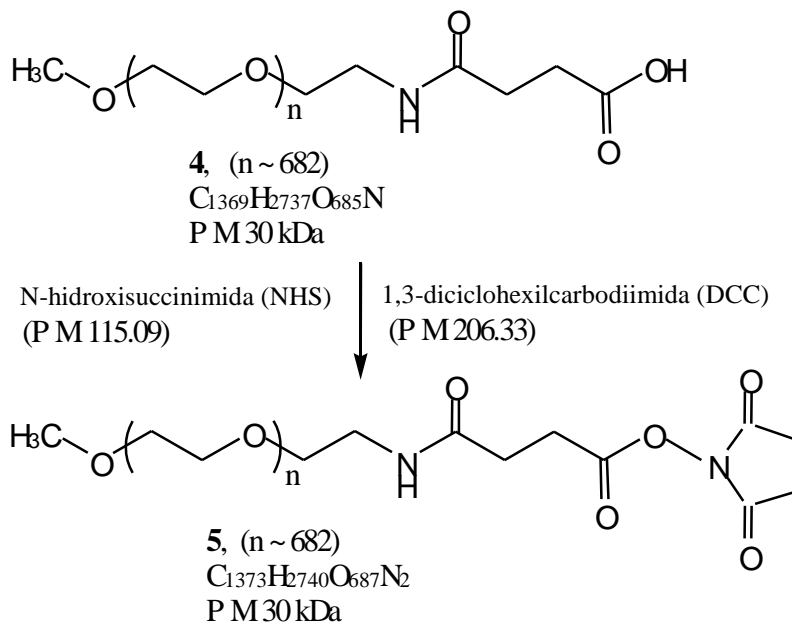
15 Paso 3. mPEG<sub>30k</sub>-Succinamida



20 Un recipiente de fondo redondeado de 1 L, equipado con un agitador magnético y un burbujeador interno de argón se relleno con 60 g (2,00 mmol) de amina de mPEG 30 kDa (**3**) y 500 mL de acetonitrilo anhidro. La solución se enfrió hasta ca. 4°C, entonces se añadieron lentamente 2 g (20,00 mmol) de anhídrido succínico en 50 mL de acetonitrilo anhidro utilizando un embudo de adición. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche bajo un flujo de gas argón.

25 Después de completarse la reacción, el solvente se evaporó hasta la sequedad mediante un evaporador rotatorio. Luego, el producto se disolvió en 400 mL de agua. El pH de la solución se ajustó a 7.0 con una solución de NaOH 1 M y se agitó durante 1 h mientras se mantuvo el pH a 7.0. A esta solución se añadieron 40g (10% en peso) de cloruro sódico y se ajustó el pH a ~4,2 con una solución de HCl 6 N. La mezcla acuosa resultante se extrajo con 200, 100, 50 mL = 350 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico anhidro durante alrededor de 1 h. Se eliminó por filtración el sulfato sódico y se concentró el filtrado en un evaporador rotatorio. Se precipitó el producto en 1 L de dietil éter frío. Se recogió el producto y se secó al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche para dar lugar a 56g (93%) de (**4**) como un sólido blanco.

30 Paso 4. mPEG<sub>30k</sub>-Succinimidil Succinamida



35

Un recipiente de fondo redondeado de 500 mL, equipado con un agitador magnético y un burbujeador interno de argón se rellenó con 56 g (1,87 mmol) de mPEG 30 kDa-Succinamida (**4**) y 500 mL de diclorometano anhidro. A esta solución se añadieron lentamente 0,24 g (2,05 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 0,46 g (2,24 mmol) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche en un flujo de gas argón.

Tras la finalización de la reacción, la mezcla se evaporó hasta la sequedad en un evaporador rotatorio. Luego, el producto se disolvió en 200 mL de tolueno anhidro y la solución se filtró a través de un filtro grueso de vidrio sinterizado pre-calentado colocado junto con un bloque de celite. El producto se precipitó mediante la adición de 1200 mL de isopropil alcohol anhidro y dietil éter frío (30:70, v/v). El producto se recogió y se secó al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche para dar lugar a 20g (80%) de **5** como un sólido blanco.

## PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS PREFERIBLES

### 15 EJEMPLO 1

Preparación de resina de enlazante Fmoc-BHA

La resina de entrecruzamiento de benzhidrilamina copoliestireno-divinilbenceno al 1% (10,0 g, 9,3 mequiv, 100-200 ASTM de malla, Advanced ChemTech) se empapó en 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se filtró y se lavó sucesivamente con 100 ml cada vez de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DIPEA al 6%/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (dos veces), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (dos veces). La resina se trató con ácido p-((R,S)-α-(1-(9H-fluoren-9-il)-metoxiformamida)-2,4-dimetoxibencil)-fenoxiacético (enlazante Fmoc) (7,01 g, 13,0 mmol), N-hidroxibenzotriazol (2,16g, 16,0 mmol), y diisopropil-carbodiimida (2,04 ml, 13,0 mmol) en 100 mL de DMF/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 25% durante 24 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y se lavó sucesivamente con 100 ml cada vez de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (dos veces), isopropanol (dos veces), DMF, y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (tres veces). Un análisis de ninhidrina de Kaiser fue negativo. La resina se secó al vacío para dar lugar a 16,12 g de Fmoc-Enlazante-Resina de BHA. Una porción de esta resina (3,5 mg) se sometió a la desprotección de Fmoc y un análisis UV cuantitativo que indicó una carga de 0,56 mmol/g.

### 30 EJEMPLO 2

Protocolo para la síntesis de péptidos mediante el sintetizador 433A de Applied Biosystems utilizando la química de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc).

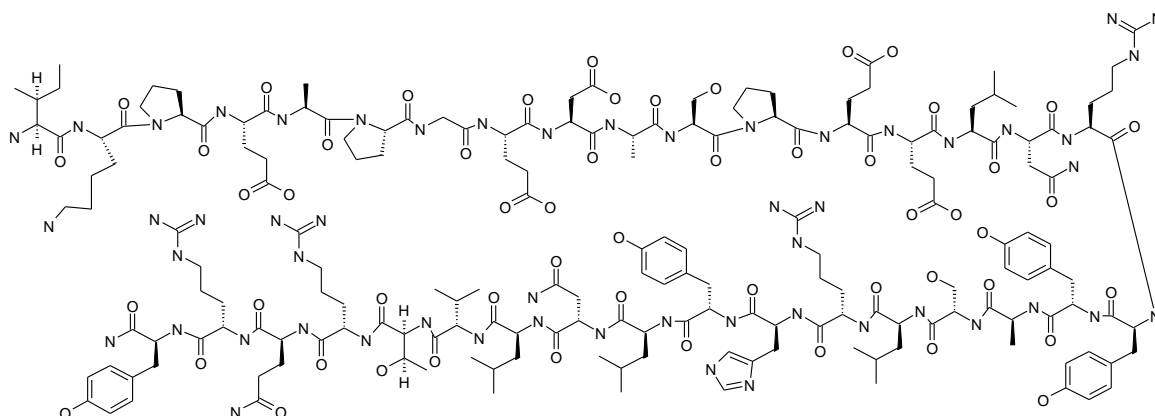
Para una escala de síntesis de péptidos de 0,25 mmol mediante el sintetizador 433A de Applied Biosystems (Foster City, CA), se utilizaron ciclos FastMoc de 0,25 mmol tanto con muestras con la resina como con muestras sin la resina, en un recipiente de reacción de 41 mL. La Fmoc-resina con aminoácidos se disolvió con 2,1 g de NMP, 2 g de HOBT/HBTU 0,45 M en DMF y DIEA 2M, luego se transfirió al recipiente de reacción. El ciclo básico de acoplamiento FastMoc se representó como "BADEIFD," en el que cada letra representa un módulo (como está definido por Applied Biosystems). Por ejemplo:

B representa el módulo para la desprotección de Fmoc utilizando Piperidina al 20%/NMP y los lavados y lecturas relacionados durante 30 min (tanto monitorización por UV como conductividad); A representa el módulo para la activación del aminoácido en cartuchos con HBTU/HOBT 0,45 M y DIEA 2,0 M y el mezclado con burbujeo de N<sub>2</sub>; D representa el módulo para el lavado con NMP de la resina en el recipiente de reacción; E representa el módulo para la transferencia del aminoácido activado al recipiente de reacción para el acoplamiento; I representa el módulo para un periodo de espera de 10 minutos con una agitación intermitente del recipiente de reacción; y F representa el módulo para la limpieza del cartucho, el acoplamiento durante aproximadamente 10 minutos y el vaciado del recipiente de reacción. Los acoplamientos se extendieron normalmente por la adición del módulo "I" una o varias veces. Por ejemplo, los acoplamientos dobles se realizaron mediante la utilización del procedimiento "BADEIIADEIFD." Estaban disponibles otros módulos, como c para los lavados de cloruro de metileno y "C" para el bloqueo con anhídrido acético. Los módulos individuales también podían modificarse mediante, por ejemplo, el cambio de los tiempos de algunas funciones, como el tiempo de transferencia, para alterar la cantidad de solvente o de reactivos transferidos. Los anteriores ciclos normalmente se utilizaron para el acoplamiento de un aminoácido. Para la síntesis de tetrapéptidos, sin embargo, los ciclos se repitieron y se encadenaron. Por ejemplo, se utilizó BADEIIADEIFD para acoplar el primer aminoácido, seguido por BADEIIADEIFD para acoplar el segundo aminoácido, seguido por BADEIIADEIFD para acoplar el tercer aminoácido, seguido por BADEIIADEIFD para acoplar el cuarto aminoácido, seguido por BIDDcc para la desprotección y lavados finales.

### 60 EJEMPLO 3

Preparación de H-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-The-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> (PYY<sub>3-36</sub>)





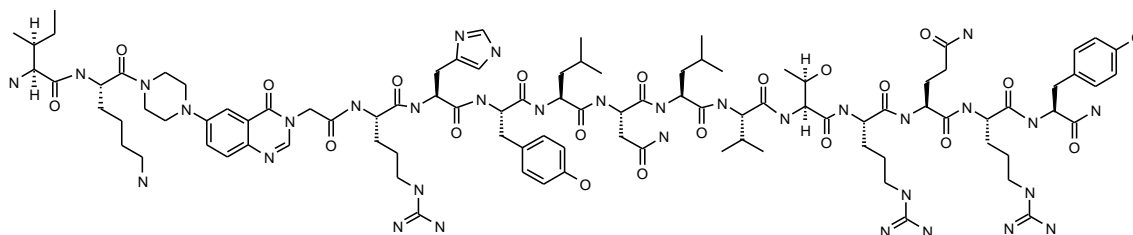
5 El péptido anterior se sintetizó utilizando química de Fmoc en un sintetizador 433A de Applied Biosystems. El sintetizador se programó para un doble acoplamiento utilizando los módulos descritos en el Ejemplo 2. La síntesis se llevó a cabo en una escala de 0,25 mmol utilizando Fmoc-enlazante-resina de BHA (450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1. Al final de la síntesis, la resina se transfirió a un recipiente de reacción en un agitador para su escisión. El péptido se escindió de la resina utilizando 13,5 mL de TFA al 97%/ H<sub>2</sub>O al 3% y 1,5 mL de triisopropilsilano durante 180 minutos a temperatura ambiente. La solución de desprotección se añadió a 100 mL de ET<sub>2</sub>O frío, y se lavó con 1 mL de TFA y 30 mL de ET<sub>2</sub>O frío para precipitar el péptido. El péptido se centrifugó en dos tubos de polipropileno de 50 mL. Los precipitados de los tubos individuales se combinaron en un único tubo y se lavaron 3 veces con ET<sub>2</sub>O frío y se secó en un desecador al vacío central.

15 El material crudo se purificó mediante HPLC preparativa en una columna C18 Pursuit (250x50mm, tamaño de partícula 10µm) y se eluyó con un gradiente lineal de 2-70% de B (tampón A: TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O; tampón B: TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN) en 90 min., una tasa de flujo de 60mL/min, y detección a 220/280 nm. Las fracciones se recogieron y se comprobaron mediante HPLC analítico. Las fracciones que contienen el producto puro se combinaron y se liofilizaron para dar lugar a 151 mg (15%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C<sub>180</sub>H<sub>279</sub>N<sub>53</sub>O<sub>54</sub> 4049,55, observado 4050,40

20

#### EJEMPLO 4

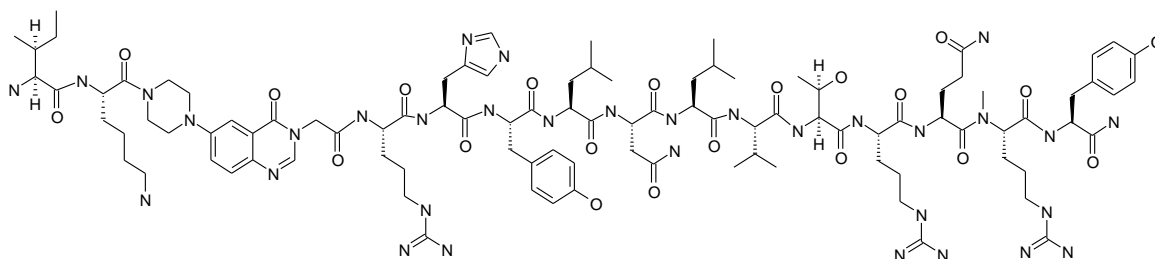
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



25 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 48 mg (9%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C<sub>98</sub>H<sub>155</sub>N<sub>33</sub>O<sub>21</sub> 2131,53, observado 2130,56.

#### EJEMPLO 5

30 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



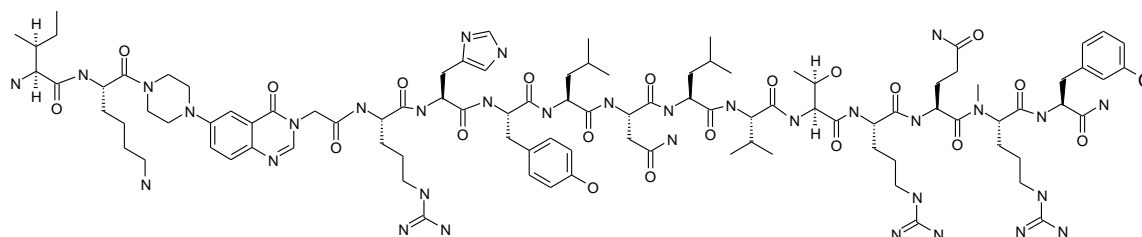
La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida (se insertó una N-metil Arg en la posición 35 de la secuencia) y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 32 mg (6%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para  $C_{99}H_{155}N_{33}O_{21}$  2143,56, observado 2143,50

5

**EJEMPLO 6**

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-m-Tyr-NH<sub>2</sub>

10 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 38.5 mg (7%) de un polvo amorfo blanco.

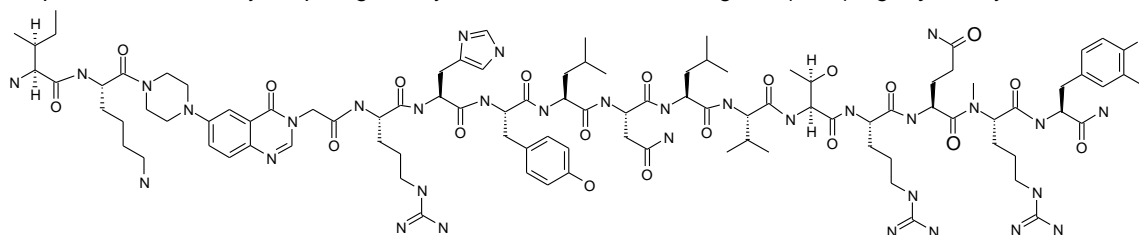


(ES)+LCMS m/e calculado para  $C_{99}H_{155}N_{33}O_{21}$  2143,5477, observado 2143,50.

**EJEMPLO 7**

15

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-3-yodo-Tyr-NH<sub>2</sub>



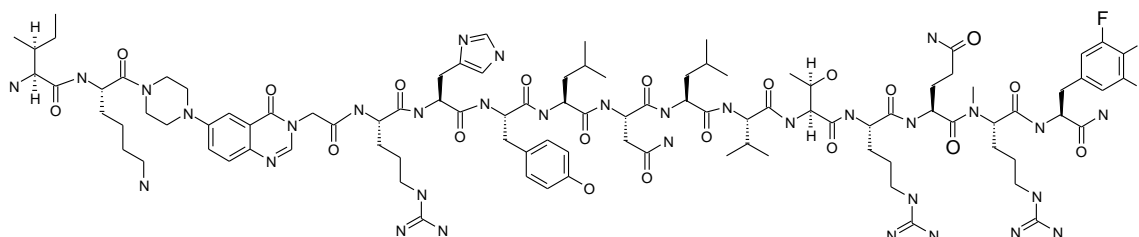
La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 41 mg (7%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para  $C_{99}H_{154}IN_{33}O_{21}$  2269,44, observado 2269,20.

20

**EJEMPLO 8**

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-3,5 di F-Tyr-NH<sub>2</sub>

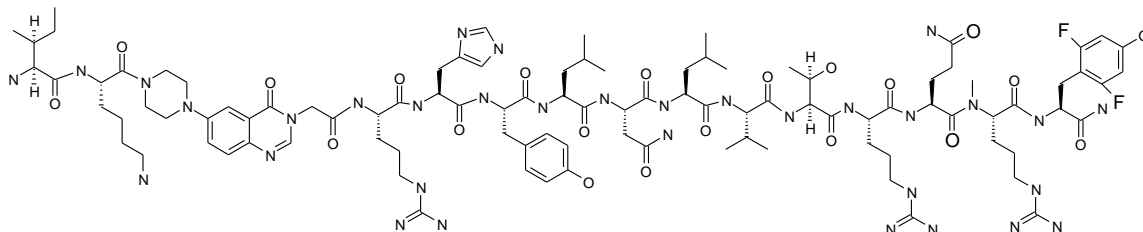
25



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 28 mg (5%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>153</sub>F<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>21</sub> 2179,52, observado 2179,46.

## 5 EJEMPLO 9

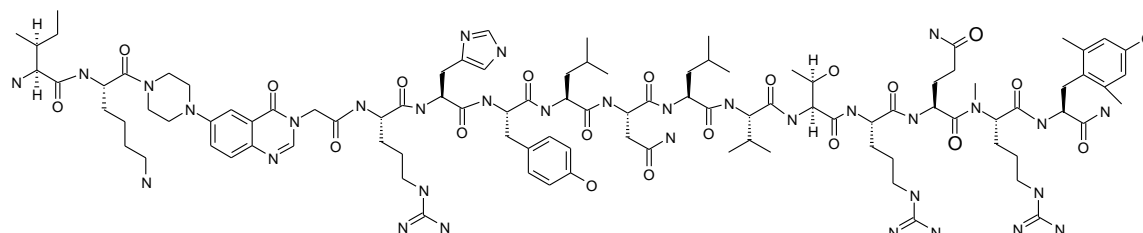
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-2,6 di F-Tyr-NH<sub>2</sub>



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 49,3 mg (9%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>153</sub>F<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>21</sub> 2179,53, observado 2179,50.

## 10 EJEMPLO 10

15 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-2,6 di Me-Tyr-NH<sub>2</sub>



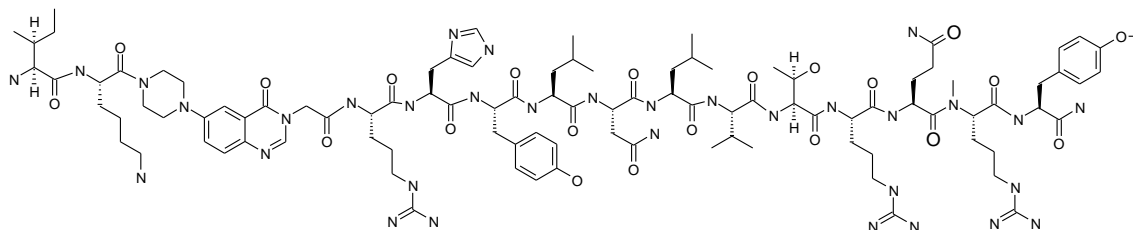
La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 13,5 mg (3%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>101</sub>H<sub>159</sub>N<sub>33</sub>O<sub>21</sub> 2171,60, observado 2171,40.

20

## EJEMPLO 11

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-4 Metoxi-Phe-NH<sub>2</sub>

25



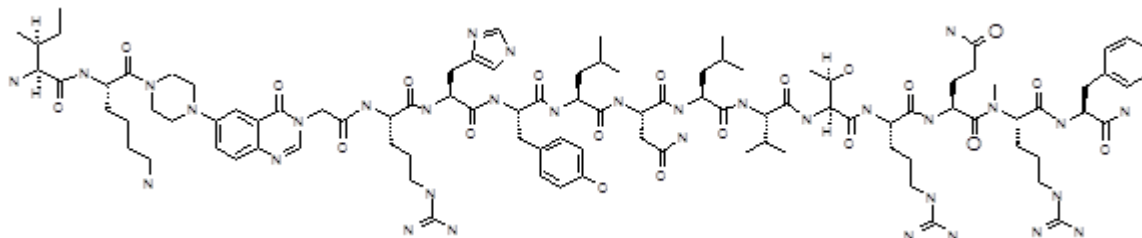
La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 72 mg (13%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>100</sub>H<sub>157</sub>N<sub>33</sub>O<sub>21</sub> 2157,57, observado 2157,58.

30

## EJEMPLO 12

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

35

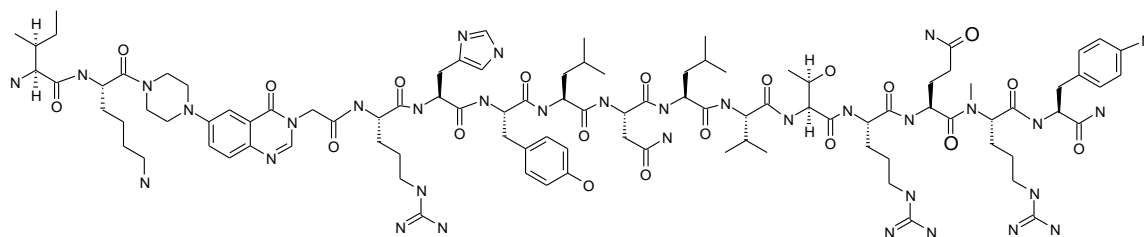


5

10 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 85,3 mg (16%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>155</sub>N<sub>33</sub>O<sub>20</sub> 2127,55, observado 2127,53.

### EJEMPLO 13

15 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-4 amino-Phe-NH<sub>2</sub>

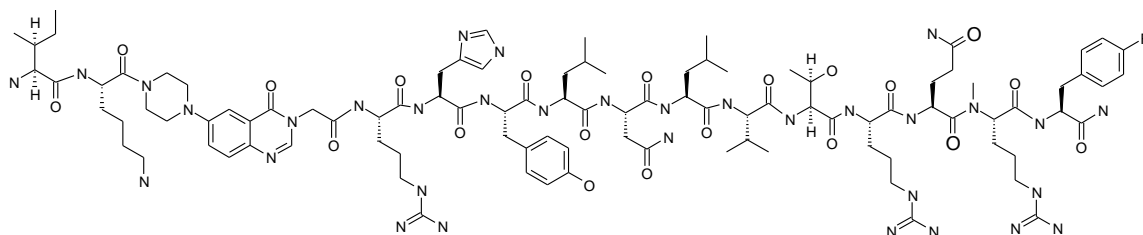


20 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 51,4 mg (10%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>156</sub>N<sub>34</sub>O<sub>20</sub> 2142,56, observado 2142,55.

### EJEMPLO 14

Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-4 F-Phe-NH<sub>2</sub>

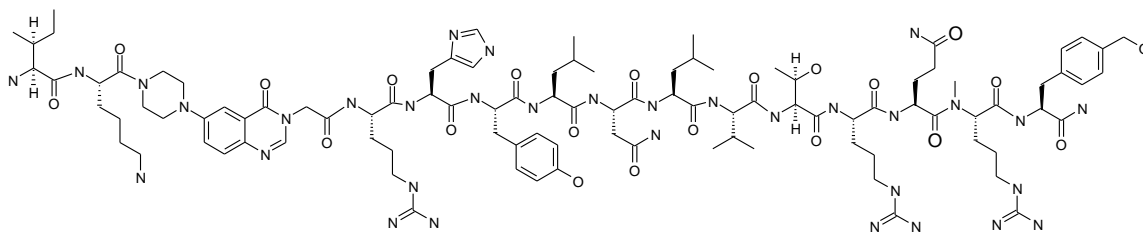
25



30 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 35 mg (7%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>154</sub>FN<sub>33</sub>O<sub>20</sub> 2145,54, observado 2145,51.

### EJEMPLO 15

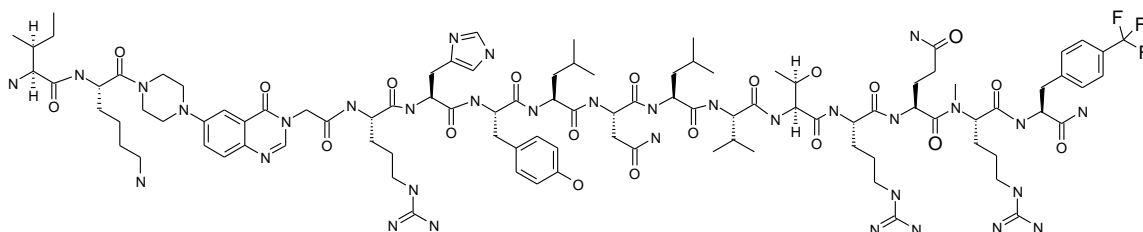
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-4-(CH<sub>2</sub>OH)-Phe-NH<sub>2</sub>



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 24 mg (4%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C100H1571N33O21 2157,57, observado 2157,56.

## 5 EJEMPLO 16

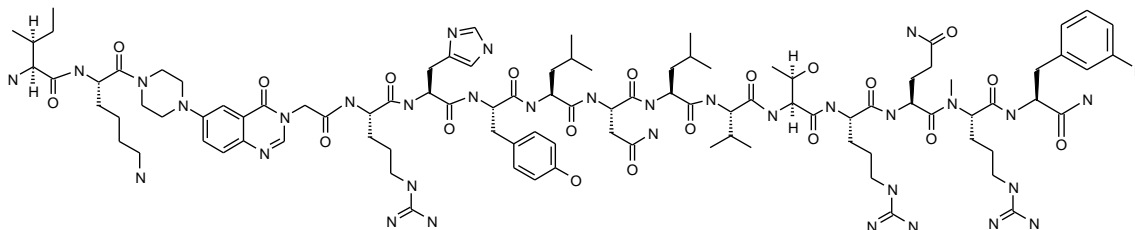
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-4- trifluoro metil-Phe-NH<sub>2</sub>



10 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 81 mg (15%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C100H154F3N33O20 2195,54, observado 2195,51.

## 15 EJEMPLO 17

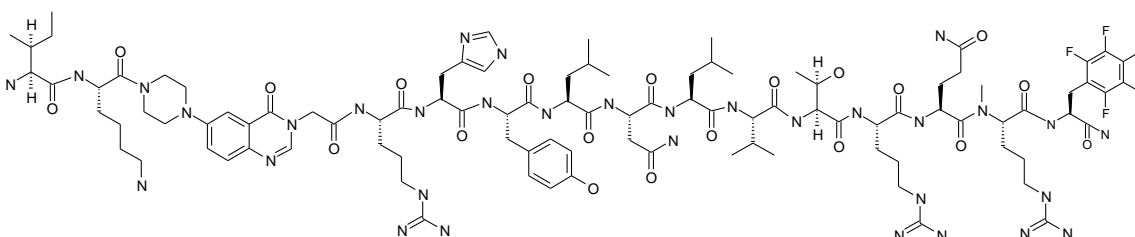
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-3 Fluoro-Phe-NH<sub>2</sub>



20 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 84 mg (16%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C99H154FN33O20 2145,54, observado 2145,53.

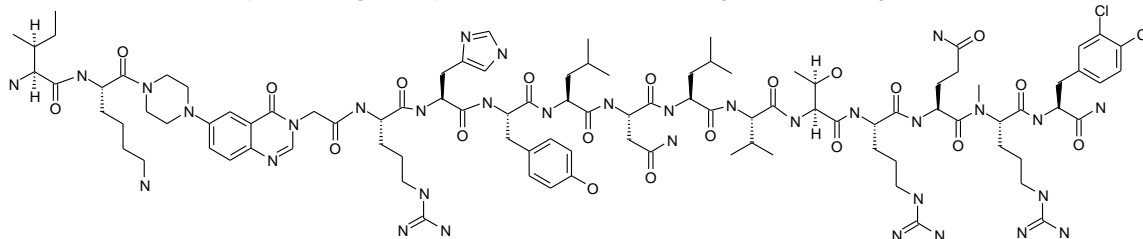
## EJEMPLO 18

25 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg- 2,3,4,5,6-Pentafluoro-Phe-NH<sub>2</sub>



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 89 mg (16%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C99H150FN33O20 2217,50, observado 2217,48.

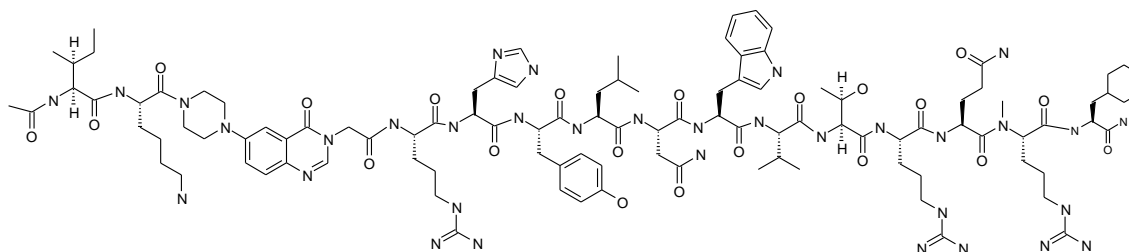
30

**EJEMPLO 19**Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-3,4-dicloro-Phe-NH<sub>2</sub>

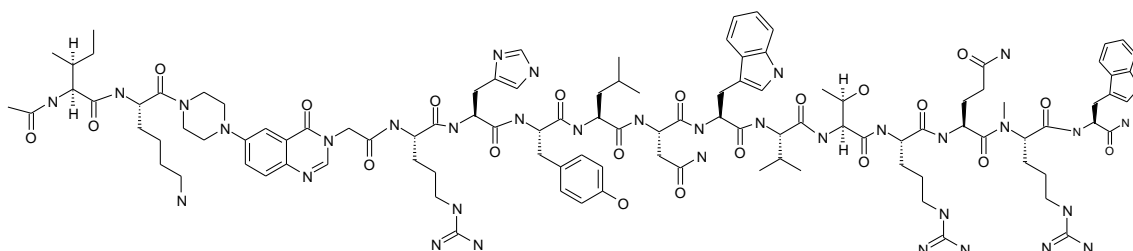
- 5 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 46 mg (8%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>99</sub>H<sub>153</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>33</sub>O<sub>20</sub> 2196,44, observado 2196,41.

**EJEMPLO 20**

- 10 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Cha-NH<sub>2</sub>



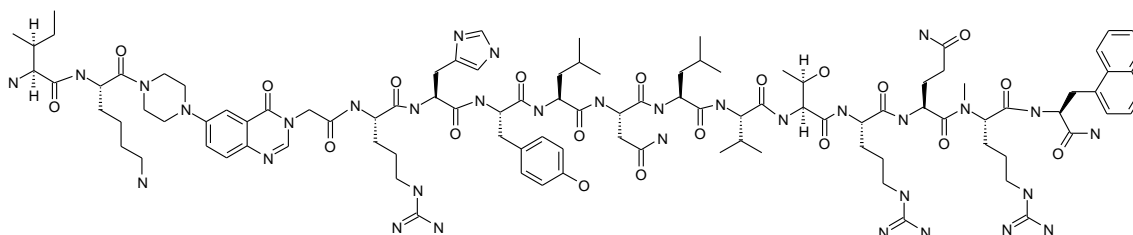
- 15 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 49 mg (9%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>106</sub>H<sub>162</sub>N<sub>34</sub>O<sub>21</sub> 2248,69, observado 2248,71.

**EJEMPLO 21**Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Trp-NH<sub>2</sub>

- 20 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 57 mg (10%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C<sub>108</sub>H<sub>157</sub>N<sub>35</sub>O<sub>21</sub> 2281,68, observado 2281,67.

**EJEMPLO 22**

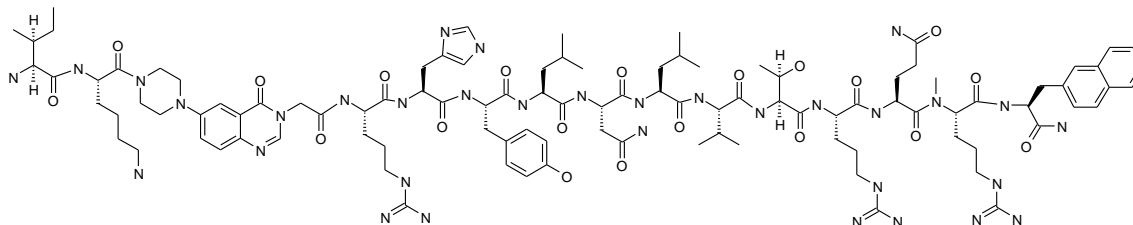
- 25 Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-1-Nal-NH<sub>2</sub>



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 45 mg (8%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C103H157N33O20 2177,61, observado 2177,59.

5 **EJEMPLO 23**

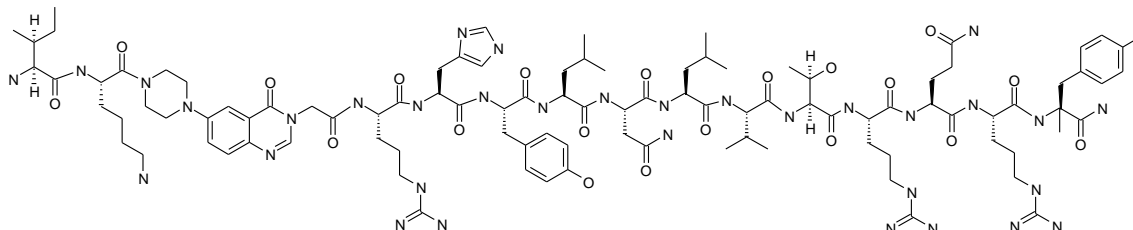
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-2-Nal-NH<sub>2</sub>



10 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 43 mg (8%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C103H157N33O20 2177,60, observado 2177,58.

**EJEMPLO 24**

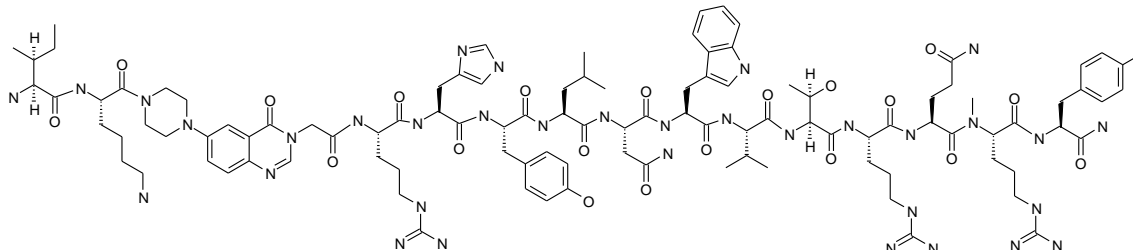
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-C- $\alpha$ -metil Tyr-NH<sub>2</sub>



15 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 35,1 mg (7%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C99H155N33O21 2143,55, observado 2143,56.

20 **EJEMPLO 25**

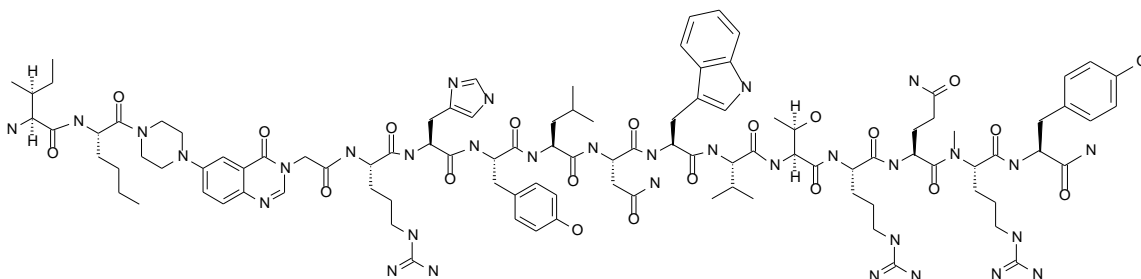
Preparación de H-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



25 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 130 mg (23%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C104H154N34O21 2216,60, observado 2216,62.

**EJEMPLO 26**

Preparación de H-Ile-Nle-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>

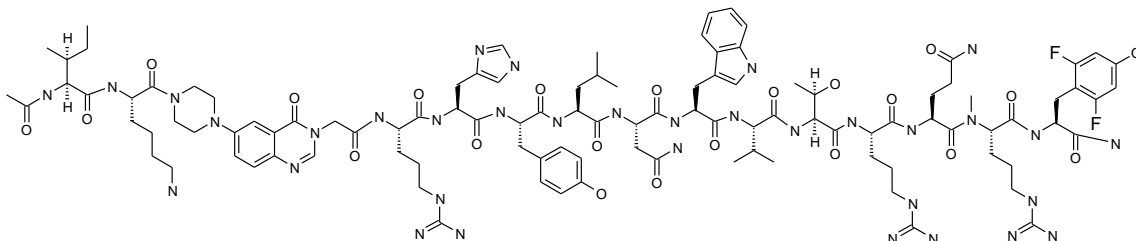


La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 84 mg (15%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C104H153N33O21 2201,59, observado 2201,56.

5

**EJEMPLO 27**

Preparación de Ac-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-2,6-F2-Tyr-NH<sub>2</sub>

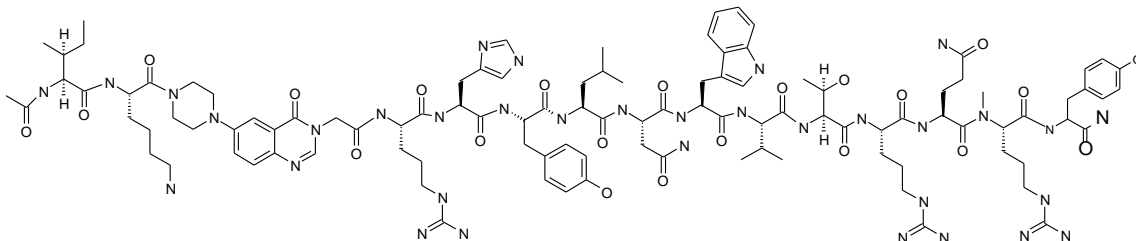


La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 24 mg (4%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C106H154F2N34O22 2099,49, observado 2100,3

10

**EJEMPLO 28**

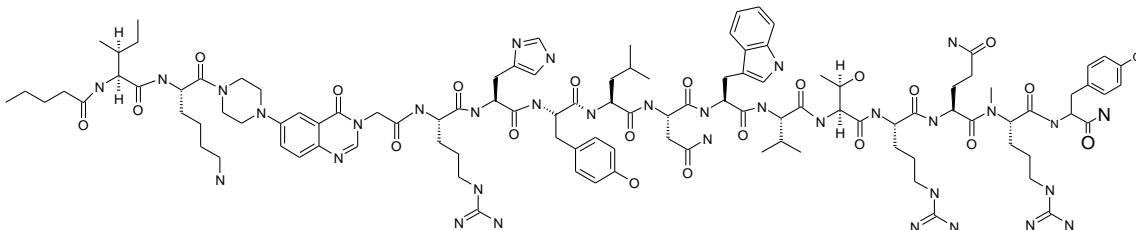
15 Preparación de Ac-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 68 mg (12%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C106H156N34O22 2258,64, observado 2258,61

**EJEMPLO 29**

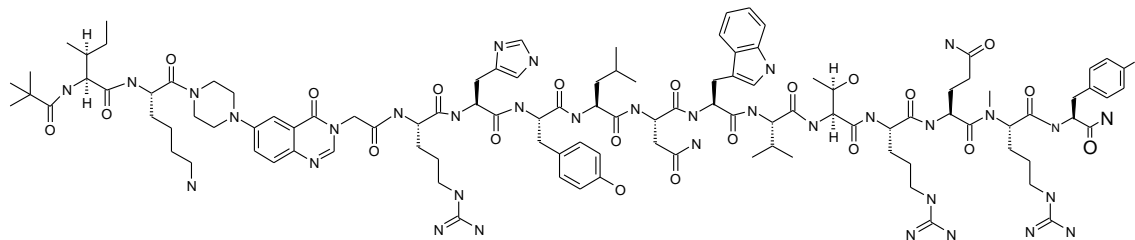
Preparación de Pentoil-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



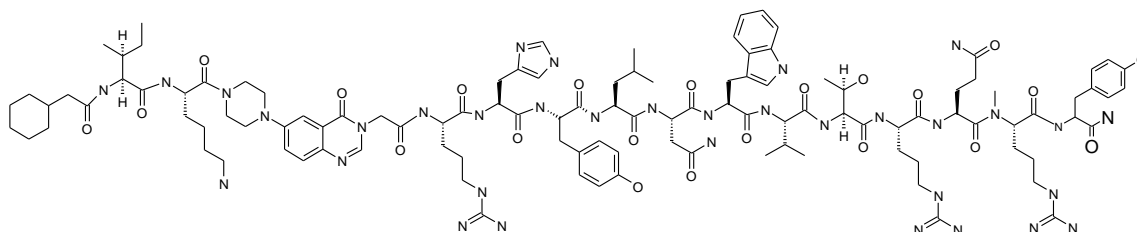
La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 67 mg (12%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+-LCMS m/e calculado para C109H162N34O22 2300,72, observado 2300,69.

25

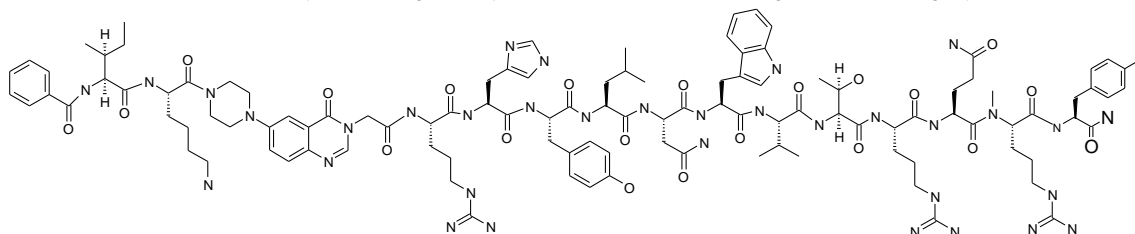


**EJEMPLO 30**Preparación de Trimetilacetil-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>

- 5 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 6 mg (1%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C109H162F2N34O22 2300,72, observado 2300,68.

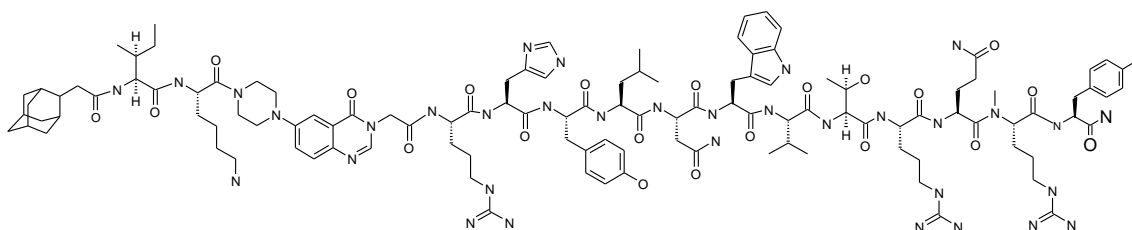
**EJEMPLO 31**Preparación de Ciclohexilacetil-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>

- 10 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 15 mg (3%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C112H166N34O22 2340,79, observado 2340,81.

**EJEMPLO 32**Preparación de Benzoil-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>

- 15 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 23 mg (4%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C111H158N34O22 2320,71, observado 2320,68.

20

**EJEMPLO 33**Preparación de Adamantoil-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>

- 25 La resina de enlazante Fmoc-BHA(450 mg, 0,25 mmol) del Ejemplo 1 se sometió a una síntesis en fase sólida y una purificación siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3 para dar lugar a 29 mg (5%) de un polvo amorfo blanco. (ES)+LCMS m/e calculado para C116H170N34O22 2392,86, observado 2392,89.

**MÉTODO ANALÍTICO PARA LOS EJEMPLOS 34-39 Y 41**

Los artículos de prueba y control se analizaron utilizando el siguiente procedimiento de HPLC de fase reversa/ UV:

- 5            Procesador de muestras automático    Módulo de separación Waters 2690 Alliance
- Volúmen de Inyección    10 µL
- Temperatura del Inyector    Ambiente
- Detector            Detector Waters 996 de disposición en Fotodiodo
- Longitud de onda del detector    280 nm
- 10            Columna            Agilent Eclipse XDB-C8, 5 micras, 150 mm x 4.6 mm i.d. PN:99367-906
- Temperatura de la columna    25°C
- Tasa de flujo    1,0 mL/minuto (~1000 psi)
- Fase movil A    Agua que contiene TFA al 0,05%
- Fase movil B    Acetonitrilo que contiene TFA al 0,05%
- 15            Tiempo de ejecución    Aproximadamente 30 minutos
- Obtención de muestras    Aproximadamente 0,2-0,5 mg/ml
- Diluyente    Agua desionizada

Estado del gradiente de la fase movil 1 (RP-HPLC1):

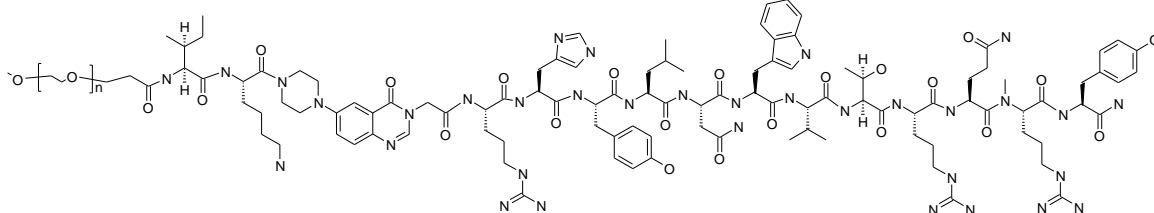
Tiempo, minutos	% Fase Movil A	% Fase Movil B	Estado
0	95	5	Rampa lineal
20	5	95	
26	95	5	Equilibrio

Estado del gradiente de la fase movil 2(RP-HPLC2):

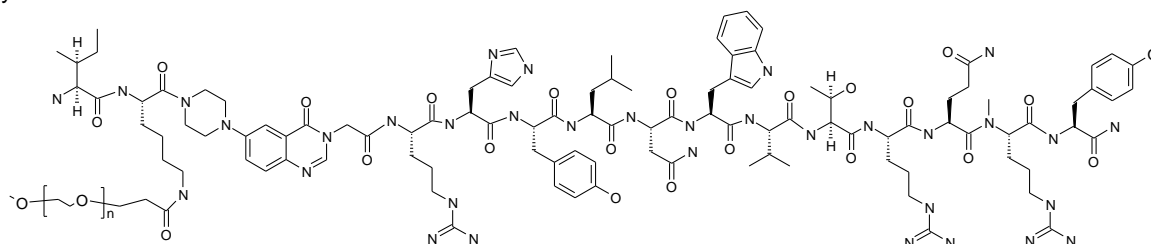
Tiempo, minutos	% Fase Movil A	% Fase Movil B	Estado
0	85	15	Rampa lineal
20	25	75	
26	85	15	Equilibrio

**EJEMPLO 34**

Preparación de una mezcla de ((PEG-30.000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> y Ile((PEG-30.000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)(ε)Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que n≈675  
y



35            en la que n≈675

Método Analítico	Resultado
RP-HPLC1–mezcla de reacción	Conversión del 69,8%
RP-HPLC1-purificado	10,1 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 33,9 kDa

5 Veinticinco mg del péptido del Ejemplo 25 se pesaron, separaron y disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 7,5. Se pesaron 500 mg de PEG 30 kDa-ácido succinimidilpropiónico (obtenido de Nektar) para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 2:1, y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. La figura 1 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 69,8% de péptido de 30 kDa.

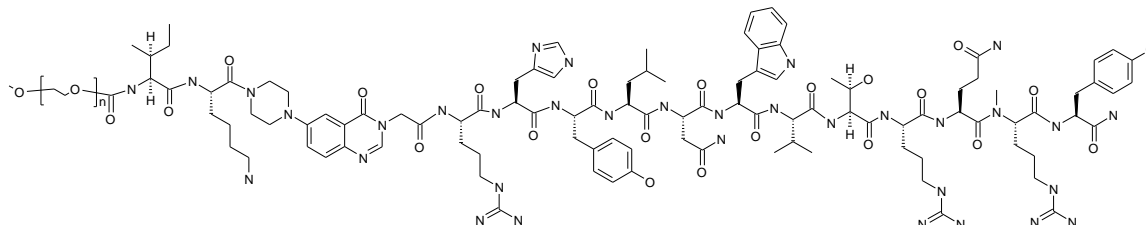
10 El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces, una vez con PBS.

15 El péptido concentrado del Ejemplo 34 se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a -20°C. La figura 2 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (RT = 10,1 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de >97%. La figura 3 es un gráfico que representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY, que se realizó para confirmar el peso molecular.

20 Se utilizó una combinación de los métodos para determinar los puntos de modificación del PEG. Estos incluyeron, MALDI-TOF MS, HPLC de fase reversa, digestión proteolítica y secuenciación N-terminal (Edman). Los resultados de estos análisis mostraron que la mayoría de PEG está unido a través del grupo ε-amino de la lisina en posición (R2) del péptido.

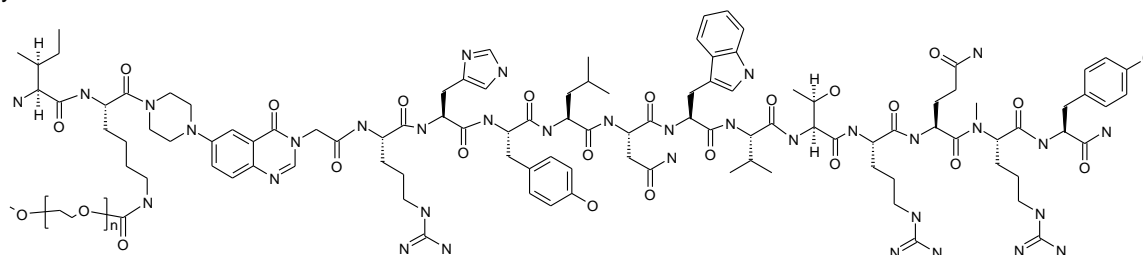
### 25 EJEMPLO 35

Preparación de una mezcla de ((PEG-40.000)CO)Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> y Ile((PEG-40.000)CO)(ε)Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que n = ~900

30 y



en la que n = ~900

Método analítico	Resultado
RP-HPLC1–mezcla de reacción	Conversión del 60,4%
RP-HPLC1-purificado	10,1 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 41,9 kDa

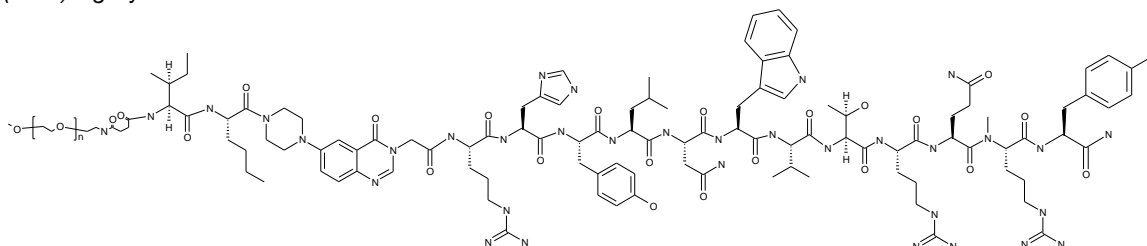
35 Veinticinco mg del péptido del Ejemplo 25 se pesaron, separaron y disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 8,0. Se pesaron 319 mg de PEG 40 kDa-carbonato de benzotriazol para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 0,8:1, y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1h antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. La figura 4 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 60,4% de péptido de 40 kDa.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces, una vez con PBS.

El péptido concentrado del Ejemplo 35 se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a -20°C. La figura 5 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 40 kDa-PYY (RT = 10,1 min). La pureza del péptido de 40 kDa se determinó era de >90%. La figura 6 es un gráfico que representa un MALDI-TOF del péptido PEG 40 kDa-PYY, que se realizó para confirmar el peso molecular.

### EJEMPLO 36

Preparación de ((PEG-30,000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)Ile-Nle-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que n = ~675

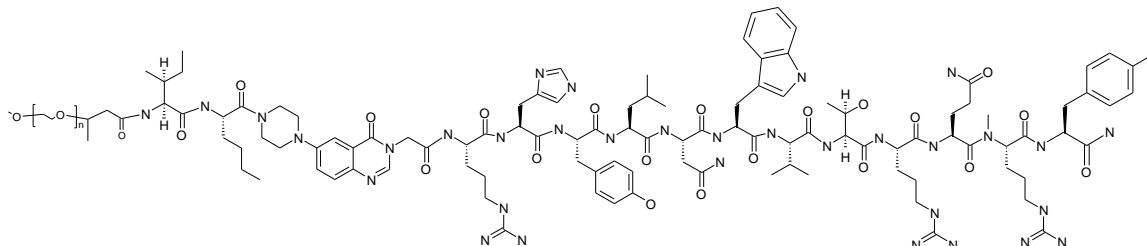
Método analítico	Resultado
RP-HPLC1–mezcla de reacción	Conversión del 94,1%
RP-HPLC1-purificado	10,4 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 34,2 kDa

Trece mg del péptido del Ejemplo 26 se pesaron, separaron y disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 8,0. Se pesaron 624 mg de PEG 30 kDa-succinimidil succinamida para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 4:1, y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF (Amersham). La figura 7 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 94.1% de péptido de 30 kDa.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido PYY monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces, una vez con PBS. El péptido concentrado del Ejemplo 36 se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a -20°C. La figura 8 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (10,4 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de >90%. La figura 9 representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY que se realizó para confirmar el peso molecular.

### EJEMPLO 37

Preparación de ((PEG-30.000)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CO)Ile-Nle-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que n = ~675

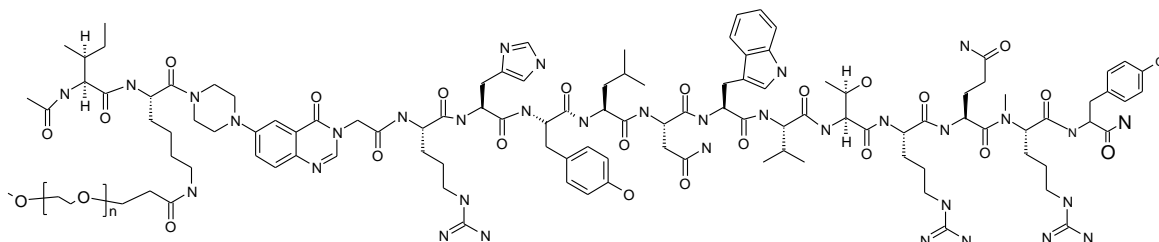
Método analítico	Resultado
RP-HPLC1–mezcla de reacción	Conversión del 93,4%
RP-HPLC1-purificado	10,5 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 34,6 kDa

1,25 mg del péptido del Ejemplo 26 se pesaron, se separaron y se disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 8,0. Se pesaron 62 mg de PEG 30 kDa-succinimidil beta-SBA para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 4:1 y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF (Amersham). La figura 10 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 93,4% del péptido de 30 kDa.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido PYY monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces, una vez con PBS. El péptido concentrado se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a -20°C. La figura 11 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (10,5 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de >90%. La figura 12 representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY que se realizó para confirmar el peso molecular.

### EJEMPLO 38

Preparación de Ac-Ile(PEG-30,000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO(εLys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que n = ~675

Método analítico	Resultado
RP-HPLC1-mezcla de reacción	Conversión del 83,3%
RP-HPLC1-purificado	9,5 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 34,6 kDa

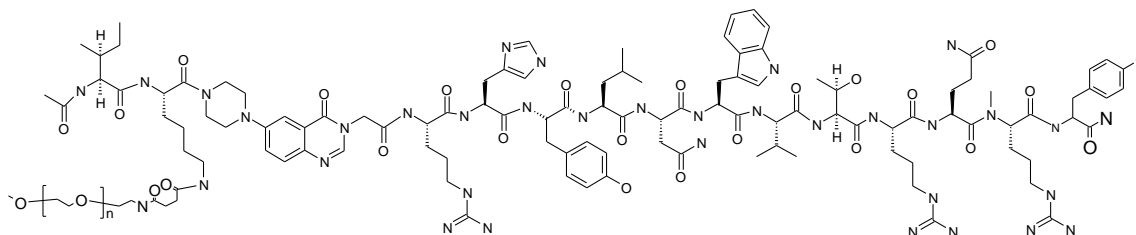
Cien mg del péptido del Ejemplo 28 se pesaron, se separaron y se disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 8,0. Se pesaron 1,8 g de PEG 30 kDa-ácido succinimidilpropiónico (obtenido de Nektar) para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 1,5:1 y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. La figura 13 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 83,3% del péptido de 30 kDa.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido PYY monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces, una vez con PBS.

El péptido concentrado del Ejemplo 38 se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a -20°C. La figura 14 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (RT = 9,5 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de >95%. La figura 15 es un gráfico que representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY que se realizó para confirmar el peso molecular.

### EJEMPLO 39

Preparación de Ac-Ile((PEG-30.000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) (εLys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



en la que  $n = \sim 675$

Método analítico	Resultado
RP-HPLC1–mezcla de reacción	Conversión del 81,4%
RP-HPLC1-purificado	9,5 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 33,6 kDa

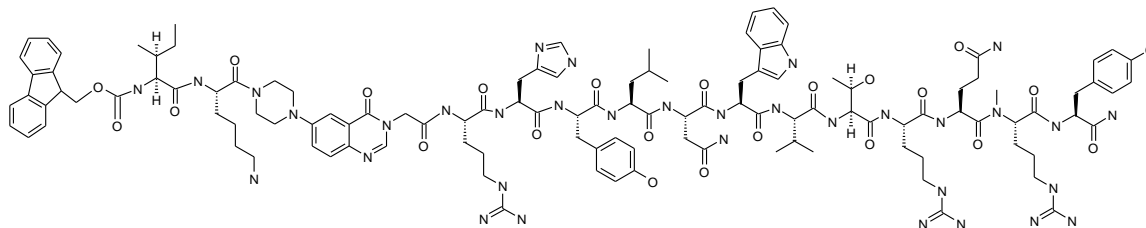
5 Cien mg del péptido del Ejemplo 28 se pesaron, se separaron y se disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 8,0. Se pesaron 3,6 g de PEG 30 kDa-succinimidil succinamida para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de 3:1 y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche antes de diluirla 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y purificarla mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. La figura 16 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al  
10 81,4% del péptido de 30 kDa.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido PYY monopegilado deseado se eluyó con NaCl 250 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces,  
15 una vez con PBS.

El péptido concentrado del Ejemplo 39 se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La figura 17 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (RT = 9,5 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de  $>97\%$ . La figura 18 es un gráfico que representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY, que se realizó para confirmar el peso molecular.  
20

#### EJEMPLO 40

Preparación de Fmoc-Ile-Lys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>



25 55,0 g de Fmoc-enlazante BHA a 0,45 mm/g (obtenido de AnaSpec Inc. nº cat. 408/452-5055) se sometió a una síntesis de péptido en fase sólida y una purificación mediante el siguiente procedimiento:

Los aminoácidos protegidos con Fmoc se acoplaron a través de DIC/HOBt en un 25% de exceso. (55,0 g X 0,45 mm/g X 1,25 equiv. = 31,0 mm). La desprotección completa se realizó en 2 X 10 min. con piperidina al 20% en DMF a aproximadamente 10 ml/g (ajustado a medida que el volumen de péptido-resina aumenta). Tras la desprotección, el péptido-resina se lavó con 4 X DMF (20 volúmenes).  
30

Todos los acoplamientos se realizaron con  $\sim 40$  mL de DIC ( $\sim 6$  equiv.) y 4,5 g de HOBt (1,25 equiv.). Tras el acoplamiento, se recogió una muestra de la solución de resina. Se lavaron  $\sim 25$  ml con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se comprobó la correcta finalización mediante ninhidrina. Tras el acoplamiento a NMe-Arg y Pqa, la resina se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se comprobó con 3 gotas de clorinal al 2% en DMAc y 3 gotas de acetaldehído al 2% en DMAc (si no aparece cambio alguno en la solución amarilla, es indicativo de que no hay aminos secundarias, y si las cuentas azules pasan a negras es indicativo de acoplamiento incompleto). Si se encontraba que los acoplamientos eran incompletos, se añadía DIEA a la solución de acoplamiento y se continuaba durante 1 h más. Cuando eran completos, la resina se lavaba con 4 X DMF (20 volúmenes).  
35  
40

Fmoc-Tyr(But)-OH: 14,0 g. Fmoc-NMeArg(Mtr)-OH: 20,0 g. Fmoc-Gln(Trt)-OH: 18,5 g. Fmoc-Arg(Pbf)-OH: 20,0 g. Fmoc-Thr(But)-OH: 18,0 g. Fmoc-Val-OH: 10,5 g. Fmoc-Trp-OH: 13,0 g. Fmoc-Asn(Trt)-OH: 18,0 g. Fmoc-Leu-OH: 11,0 g. Fmoc-Tyr(But)-OH: 14,0 g. Fmoc-His(Trt)-OH: 20,0 g. Fmoc-Arg(Pbf)-OH: 20,0 g. Fmoc-Pqa-OH: 15,4 g.

Fmoc-Lys(Boc)-OH: 14,1 g. Fmoc-Ile-OH: 11,0 g.

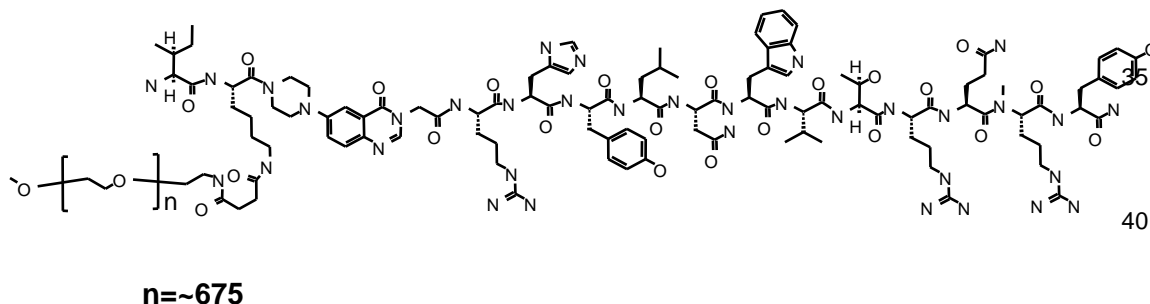
El péptido-resina se lavó con 3 X DMF, 3 X CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 3 X MeOH y se secó bajo succión para obtener 115,38 g del péptido-resina. La resina se separó en 6 piezas de 19,25 g para la escisión con TFA.

19,25 g del péptido-resina se escindieron con 8,0 mL de DTE, anisol y tioanisol 1:1:1, 8,0 mL de iPr<sub>3</sub>SiH, 8,0 mL de H<sub>2</sub>O y 200 mL de TFA, durante 6 horas (de 6:30 AM a 13:30 PM), seguido de una precipitación en 2,0 L de Et<sub>2</sub>O frío (a -20°C). El precipitado se recogió por centrifugación en 8 tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se lavó 3 X con Et<sub>2</sub>O frío. El precipitado se secó entonces al vacío central durante toda la noche para obtener 6,5 g del péptido crudo. La cantidad total de péptido crudo tras las 6 desprotecciones fue de 38,71 g.

La purificación de péptido crudo se realizó en un sistema Shimadzu LC-8A mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna Pursuit C-18 de fase reversa (50 x 250 mm. 300 A, 10µm). Se purificaron 38,71 g de péptido crudo en 36 preparaciones. Cada vez, se disolvió aproximadamente 1,1 g de péptido crudo en una cantidad mínima de agua y acetonitrilo y se inyectó en una columna. La elución en gradiente generalmente se inició con tampón B al 20%, B del 20%-70% a lo largo de 70 minutos, (tampón A: TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O, tampón B: TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN) a una tasa de flujo de 50 ml/min. La detección con UV se realizó a 220/280 nm. Las fracciones que contenían los productos se separaron y se analizó la pureza en un sistema analítico Shimadzu LC-10AT utilizando una columna Pursuit C18 de fase reversa (4,6 x 50 mm) a una tasa de flujo de 2,5 ml/min., con un gradiente (del 20-70%) a lo largo de 10 min. (tampón A: TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O, tampón B: TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN). Las fracciones consideradas de una pureza elevada se agruparon y liofilizaron para dar lugar un polvo amorfo blanco. El producto liofilizado de las treinta y seis preparaciones se combinó y se liofilizó de nuevo para dar lugar a 8,233 g de péptido puro (12,6%). La pureza del producto final se comprobó de nuevo mediante HPLC analítico en una columna de fase reversa como se indica anteriormente y fue de aproximadamente un 95-99%. (ES)+-LCMS m/e calculado para C<sub>119</sub>H<sub>164</sub>N<sub>34</sub>O<sub>23</sub> 2438,85, observado 2438,84

#### EJEMPLO 41

Preparación de Ile((PEG-30.000)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) (εLys-Pqa-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Trp-Val-Thr-Arg-Gln-(NMe)Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>)



Método analítico	Resultado
RP-HPLC2	Conversión del 93,8% – PEG-péptido protegido Rendimiento total de 89,5% – PEG-péptido desprotegido
RP-HPLC2-purificado	10,1 min tiempo de retención
MALDI-TOF MS	Masa promedio = 35 kDa

1,8 g del péptido del Ejemplo 40 se pesaron, se separaron y se disolvieron en tampón borato 50 mM, pH 7,5. Se pesaron 37,5 g de PEG 30 kDa-succinimidil succinamida para alcanzar una proporción molar de PEG:péptido de aproximadamente 2:1, y se añadió al péptido disuelto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El péptido pegilado se desprotegió mediante la adición de piperidina (20%) a la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se introdujo en hielo y se acidificó mediante la adición lenta de ácido acético glacial (20%). Entonces se diluyó la mezcla de reacción 10 veces en tampón NaOAc 20 mM, pH 4,5 y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose FF. La figura 19 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción. La reacción dio lugar al 93,8% del péptido pegilado protegido. La figura 20 es un cromatograma de HPLC de la mezcla de reacción desprotegida, en la que el rendimiento total de péptido pegilado desprotegido fue del 89,5%.

El péptido PYY monopegilado se eluyó mediante un gradiente de NaCl escalonado. Normalmente, el péptido monopegilado deseado se eluyó con NaCl 175 mM. El péptido tipo PEG-PYY eluido se concentró en una célula de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana con un paso de 10 kDa de PM. Entonces, éste se diafiltró 10 veces,

una vez con PBS.

El péptido concentrado se envió para ser analizado, ensayado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La figura 21 es un cromatograma de HPLC de péptido purificado PEG 30 kDa-PYY (RT = 10,1 min). La pureza del péptido de 30 kDa se determinó era de  $>95\%$ . La figura 22 es un gráfico que representa un MALDI-TOF del péptido PEG 30 kDa-PYY, que se realizó para confirmar el peso molecular.

#### EJEMPLO 42

##### 10 Ensayo del flujo de calcio

Células HEK-293 transfectadas de forma estable con la proteína G quimera Gαq19 y el gen de resistencia a la higromicina-B, se transfectaron con el receptor NPY2 humano y una selección por antibiótico G418. Tras una selección tanto con higromicina-B como con G418, se realizó un ensayo de la respuesta a PYY en clones individuales. Las células transfectadas (HEK293/hNPY2R) se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, higromicina-B 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y G418 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las células se recogieron con tripsina-EDTA y se contaron utilizando un reactivo ViaCount. El volumen de la suspensión celular se ajustó a  $4,8 \times 10^5$  células/ml con medio de crecimiento completo. Se dispensaron alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  en microplacas de 384 pocillos negras traslucidas recubiertas de poli-D Lisina (Falcon) y las microplacas se dejaron en un incubador de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Se preparó tampón de carga (Equipo de ensayo Calcium-3, Molecular Devices) mediante la disolución del contenido de un vial (Equipo express) en 1000 ml de Solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contiene HEPES 20 mM y probenecid 5 mM. Se dispensaron alícuotas (25  $\mu\text{l}$ ) del colorante diluido en las placas de células, y entonces las placas se incubaron durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Durante la incubación, se prepararon compuestos de prueba a 3,5x de la concentración deseada en HBSS (HEPES 20 mM)/BSA al 0,05%/DMSO al 1% y se transfirieron a una placa de 384 pocillos para su utilización en un FLIPR® (FLIPR, del inglés, lector de placas analizador de imagen fluorescente, es una marca registrada de Molecular Devices Corp.).

Tras la incubación, tanto las placas con células como con el compuesto se llevaron al FLIPR® y se transfirieron 20  $\mu\text{L}$  de los compuestos diluidos a las placas con células mediante el FLIPR®. Durante el ensayo, las lecturas de fluorescencia se tomaron simultáneamente de los 384 pocillos de la placa con células cada 1,5 segundos. Se tomaron cinco lecturas para establecer una línea basal estable, y entonces se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de muestra rápidamente (30  $\mu\text{l}/\text{s}$ ) y simultáneamente a cada pocillo de la placa con células. La fluorescencia se monitorizó de forma continua antes, durante y después de la adición de muestra durante un tiempo total de 100 segundos. Se determinaron las respuestas (aumento del pico de fluorescencia) en cada pocillo tras la adición. La lectura inicial de fluorescencia de cada pocillo, previa a la estimulación del ligando, se utilizó como un valor basal de cero para los datos de ese pocillo. Las respuestas se expresaron como un porcentaje de la respuesta máxima del control positivo.

#### EJEMPLO 43

##### 45 Ensayo de AMP cíclico

En este ejemplo, se utilizaron los siguientes materiales: placas de 384 pocillos; equipo Tropix cAMP-Screen: (Applied Biosystems, n° cat. T1504); forskolina (Calbiochem n° cat. 344270); células: células HEK293/hNPY2R; medio de plaqueo: DMEM/F12 sin rojo fenol (Gibco n° cat. 1133032); FBS al 10% inactivado con calor (Gibco n° cat. 10082-147); penicilina/estreptomycin al 1% (Gibco n° cat. 15140-122); G418 500 mg/ml (geneticina, Gibco n° cat. 11811-031).

Las células HEK293/hNPY2R se plaquearon a una densidad de  $10^4$  células/pocillo en una placa de 384-pocillos utilizando un dispensador Multi-drop y las placas se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, las células que alcanzaron un 75-85% de confluencia, se utilizaron en el experimento. Los medios y reactivos se atemperaron hasta temperatura ambiente. Antes de preparar las diluciones, se permitió que la solución de partida de ligandos del receptor Y2 y de controles en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma n° cat. D2650) se calentara hasta  $32^{\circ}\text{C}$  durante 5-10 min. Las diluciones se realizaron utilizando medio de incubación [medio DMEM/F12 que contiene 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX, Calbiochem n° cat. 410957) y BSA 0,5 mg/ml (Sigma n° cat. A8806)]. Las concentraciones finales de DMSO y forskolina en el medio de incubación fueron del 1,1% y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Los medios de plaqueo se eliminaron mediante una suave inversión de la placa de 384 pocillos sobre una toalla de papel y se reemplazó por medio de incubación (50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) que contiene varias concentraciones de ligandos del receptor Y2 (cuatro réplicas/concentración). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Tras el periodo de tratamiento de 30 min, el medio de incubación se descartó y se reemplazó con 50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de tampón de lisis de ensayo (proporcionado en el equipo Tropix). Las células se lisaron mediante la incubación de las placas durante 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . El lisado (20  $\mu\text{l}$ ) se transfirió a las placas pre-recubiertas de anticuerpo (de 384 pocillos)



proporcionadas con el equipo Tropix. Se añadió a cada pocillo un conjugado de AP (10 µl) y de un anticuerpo anti-cAMP (20 µl) y las placas se incubaron sobre un agitador a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado (70 µl/pocillo/lavado) y las placas se golpearon suavemente hasta la sequedad. Se añadió una solución CSPD/Saphire-II RTU sustrato/potenciador (30 µl/pocillo) y se incubó durante 45 min. a temperatura ambiente. Se midió la señal en cada pocillo (1 s/pocillo) utilizando un luminómetro (VICTOR-V).

Los compuestos de la presente invención mostraron una actividad selectiva sobre el receptor del neuropéptido-2 *in vitro*, como se demuestra en el ensayo de flujo de calcio (FLIPR®; Ejemplo 42) y el ensayo de AMP cíclico (Ejemplo 43). El resumen de los resultados *in vitro*, las CE<sub>50</sub> de los ejemplos de 3 a 39 y 41, se ilustran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Ej.	Secuencia	Y2R CE <sub>50</sub> (nM) FLIPR	Y2R CE <sub>50</sub> (nM) cAMP	Y1R CE <sub>50</sub> (nM) FLIPR	Y4R CE <sub>50</sub> (nM) FLIPR	Y5R CE <sub>50</sub> (nM) FLIPR
3	IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY (3-36)	0,12	0,033	63	3238	265
4	IK-Pqa-RHYLNLVTRQRY	0,28	0,047	57	>5000	1887
5	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RY	2,3	0,42	>5000	>5000	>5000
6	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(m-)Y	3,32	1,5	>5000	>5000	>5000
7	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3-l)Y	1,15	0,31	173	>5000	>5000
8	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3-5 di F)Y	0,15	0,36	>5000	>5000	>5000
9	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2-6 di F)Y	0,11	0,19	303	>5000	>5000
10	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2-6 di Me)Y	0,28	0,67	762	>5000	>5000
11	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RF(O-CH3)	0,74	0,55	189	>5000	>5000
12	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RF	1,54	0,69	422	>5000	>5000
13	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-NH2)Phe	11,4	0,31	>5000	>5000	>5000
14	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-F)Phe	0,45	0,96	>5000	>5000	2259
15	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-CH2OH)Phe	0,46	0,45	>5000	>5000	>5000
16	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(4-CF3)Phe	6,13	3,55	3268	>5000	729
17	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3-F)Phe	0,635	0,75	>5000	>5000	>5000
18	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2,3,4,5,6-penta-F)Phe	11,9	2,5	>5000	>5000	>5000
19	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(3,4-di Cl)Phe	4,03	1,47	>5000	>5000	>5000
20	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RCha	0,498	0,5	>5000	>5000	352
21	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)RW	0,454	1,06	>5000	>5000	>5000
22	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(1)Nal	2,73	1,14	>5000	>5000	4772
23	IK-Pqa-RHYLNLVTRQ(N-metil)R(2)Nal	4,11	2,4	>5000	>5000	2162
24	IK-Pqa-RHYLNLVTRQR-C-α-Me-Tyr	5,44	1,35	3259	>5000	
25	IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	0,44	0,25	298	>5000	>5000

26	INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	8,1	0,108	>5000	>5000	>5000
27	Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ (N-metil)R(2-6 di F)Y	1,44	0,07	>5000	>5000	5812
28	Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ (N-metil)RY	0,458	0,18	>5000	>5000	>5000
29	Pentil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	0,873	0,51	>5000	>5000	>5000
30	Trimetilacetil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	1,1	0,26	>5000	>5000	>5000
31	Ciclohexil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	1,67	1,37	>5000	>5000	>5000
32	Benzoil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	0,79	0,66	>5000	>5000	>5000
33	Adamtil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	2,33	2,9	>5000	>5000	>5000
34	(PEG 30.000 SPA)IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	37,9	18	>5000	>5000	>5000
35	(PEG 40.000 BTC)IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	590	14,7	>5000	>5000	>5000
36	(PEG 30.000 SSA) INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	289	7,8	>5000	>5000	>5000
37	(PEG 30.000 beta-SBA) INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	239	22,4	>5000	>5000	>5000
38	Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SPA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	549	24,4	>5000	>5000	>5000
39	Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	1078	20,7	>5000	>5000	>5000
41	IK(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY	13,5	9,8	>5000	>5000	>5000

**EJEMPLO 44**

Estudio crónico en ratas DIO

5 Se obtuvieron ratas macho Sprague Dawley (de 7 semanas de edad) de los laboratorios Charles River (USA) y se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad controladas con un ciclo de 12 h de luz:12 h de oscuridad. Las ratas tuvieron libre acceso a una dieta controlada alta en grasas (HFD; con un 60% de las kcal de la dieta como grasas, Research Diets D12492) y agua a lo largo del estudio. Tras 7 semanas con la HFD, las ratas se separaron según su peso corporal y se enjaularon individualmente. Las dosis se administraron a las ratas previamente al inicio del ciclo oscuro, con vehículo (s.c.) o con el compuesto del Ejemplo 41 (1, 5 y 10 mg/kg, s.c.) una vez cada dos días durante 3 semanas (N = 6-8 ratas/ grupo). El peso corporal se registró en los días que se indican en la Figura 23.

15 *Análisis de los datos:*

15 Todos los datos que se muestran son la media  $\pm$  error estándar (s.e.m). La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando una ANOVA unifactorial, seguido de una prueba de Dunnett para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el vehículo y con el fármaco. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una  $P < 0,05$ . El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad (GraphPad Prism).

20 *Resultados:*

25 La administración crónica del compuesto del Ejemplo 41 (5 y 10 mg/kg, cada 48 h, s.c.) en ratas macho DIO indujo un descenso significativo de la ganancia de peso corporal frente a los animales tratados con vehículo tras un periodo de tratamiento de 3 semanas (Figura 23).

Estudio agudo en ratones *db/db*

30 Se recibieron ratones hembra *db/db* (C57BL/KsJ-*Lep<sup>db/db</sup>*, Jackson Laboratories, USA) de 6 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad controladas con un ciclo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad, y tuvieron libre acceso al alimento (Dieta controlada para roedores 5008 de Purina) y al agua. Se extrajo una muestra de sangre de los ratones (de 12 semanas de edad) 4 días antes del estudio, y se seleccionaron para el estudio aquellos que estaban dentro de un pequeño intervalo de niveles de glucosa en sangre en ayunas, con el fin de minimizar la variabilidad entre los grupos tratados con vehículo control y con fármaco. Se administró a los ratones vehículo (s.c.) o el compuesto del Ejemplo 41 (0,3, 1 y 10 mg/kg, s.c.), 28 h antes de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (N = 10 ratones/ grupo). Se recogieron muestras de sangre de cortes de cola tras de 6 h de ayuno,

para determinar los valores de línea basal ( $t = 0$  min.). Entonces se hizo que los ratones ingirieran un bolo oral de glucosa (1 g/ kg), y se recogieron muestras de sangre adicionales a intervalos regulares ( $t = 30, 60$  y  $120$  min.) para la medición de glucosa. Para analizar los efectos del compuesto del Ejemplo 41 sobre la tolerancia a la glucosa oral se calculó la diferencia absoluta entre la glucosa en sangre y la línea basal (glucosa en sangre en ayunas) para cada punto de tiempo. El área bajo la curva ( $AUC_{0-120 \text{ min}}$ ) se determinó utilizando el método del trapecoide.

#### Análisis de los datos:

Todos los datos que se muestran son la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.). La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando una ANOVA unifactorial, seguido de una prueba de Dunnett para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el vehículo y con el fármaco. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una  $P < 0,05$ . El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad (GraphPad Prism).

#### Resultados:

Una administración aguda del compuesto del Ejemplo 41 (1 y 10 mg/kg, s.c.) a ratones hembra *db/db* disminuyó significativamente las fluctuaciones de los niveles de glucosa en respuesta a una exposición oral a glucosa (Figura 24).

#### Estudio crónico en ratones *db/db*

Se recibieron ratones hembra *db/db* (C57BL/KsJ-*Lep<sup>db/db</sup>*, Jackson Laboratories, USA) de 6 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad controladas con un ciclo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad, y tuvieron libre acceso al alimento (Dieta controlada para roedores 5008 de Purina) y al agua. Se extrajo una muestra de sangre de los ratones (de 9 semanas de edad) 4 días antes del tratamiento con el fármaco, y se seleccionaron para el estudio aquellos que estaban dentro de un pequeño intervalo de niveles de glucosa en sangre en ayunas, con el fin de minimizar la variabilidad entre los grupos tratados con vehículo control y con fármaco. Se administró a los ratones vehículo (s.c.) o el compuesto del Ejemplo 41 (1, 3 y 10 mg/kg, s.c.), una vez cada dos días durante 3 semanas ( $N = 10$  ratones/ grupo). Se realizaron mediciones semanales de los niveles basales de glucosa en sangre en ayunas (de 2 a 6 h). En el día 20 del estudio, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral tras 6 h de ayuno. Se recogieron muestras de sangre de cortes de cola para determinar los valores de línea basal ( $t = 0$  min.). Entonces se hizo que los ratones ingirieran un bolo oral de glucosa (1 g/ kg), y se recogieron muestras de sangre adicionales a intervalos regulares ( $t = 30, 60$  y  $120$  min.) para la medición de glucosa. Para analizar los efectos del compuesto del Ejemplo 41 sobre la tolerancia a la glucosa oral se calculó la diferencia absoluta entre la glucosa en sangre y la línea basal (glucosa en sangre en ayunas,  $t = 0$  min.) para cada punto de tiempo. El área bajo la curva ( $AUC_{0-120 \text{ min}}$ ) se determinó utilizando el método del trapecoide.

#### Análisis de los datos:

Todos los datos que se muestran son la media  $\pm$  desviación estándar (s.d.). La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando una ANOVA unifactorial, seguido de una prueba de Dunnett para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con el vehículo y con el fármaco. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una  $P < 0,05$ . El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad (GraphPad Prism).

#### Resultados:

La administración crónica del compuesto del Ejemplo 41 (1, 3 y 10 mg/kg, cada 48 h, s.c.) en ratones hembra *db/db* redujo los niveles basales de glucosa en sangre (días 8, 15 y 21) frente a los animales tratados con vehículo tras un periodo de tratamiento de 3 semanas (Figura 25A). Como se muestra en la Figura 25B, en el día 20 el compuesto del Ejemplo 41 (tanto a 3 como a 10 mg/kg, cada 48 h, s.c.) disminuyó significativamente las fluctuaciones de los niveles de glucosa en respuesta a una exposición oral a glucosa.

#### Ejemplo A

Pueden elaborarse de un modo convencional comprimidos recubiertos de película que contienen los siguientes ingredientes:

#### Ingredientes

#### Por comprimido

Núcleo:		
Compuesto de fórmula (I)	10,0 mg	200,0 mg
Celulosa microcristalina	23,5 mg	43,5 mg
Lactosa hidratada	60,0 mg	70,0 mg
Povidona K30	12,5 mg	15,0 mg
Glicolato de almidón sódico	12,5 mg	17,0 mg
Estearato magnésico	1,5 mg	4,5 mg

(Peso del núcleo)	120,0 mg	350,0 mg
<b>Película de recubrimiento:</b>		
Hidroxipropil metilcelulosa	3,5 mg	7,0 mg
Polietilenglicol 6000	0,8 mg	1,6 mg
Talco	1,3 mg	2,6 mg
Óxido de hierro (amarillo)	0,8 mg	1,6 mg
dióxido de Titan	0,8 mg	1,6 mg

5 El ingrediente activo se tamizó y se mezcló con celulosa microcristalina y la mezcla se granuló con una solución de polivinilpirrolidona en agua. El granulado se mezcló con glicolato de almidón sódico y estearato magnésico, y se comprimió para dar lugar a núcleos de 120 o 350 mg respectivamente. Los núcleos se lacaron con una solución/suspensión acuosa de la anteriormente mencionada película de recubrimiento.

### Ejemplo B

Pueden elaborarse de un modo convencional cápsulas que contienen los siguientes ingredientes:

<u>Ingredientes</u>	<u>Por cápsula</u>
Compuesto de fórmula (I)	25,0 mg
Lactosa	150,0 mg
Almidón de maíz	20,0 mg
Talco	5,0 mg

10

Los componentes se tamizan, se mezclan y se introducen en cápsulas de tamaño 2.

### Ejemplo C

15 Las soluciones inyectables pueden tener la siguiente composición:

Compuesto de fórmula (I)	3,0 mg
Polietilenglicol 400	150,0 mg
Ácido acético	c.s.p. pH 5,0
Agua para soluciones inyectables	c.s.p. 1,0 ml

20

El ingrediente activo se disuelve en una mezcla de polietilenglicol 400 y agua para inyección (una parte). Se ajusta el pH a 5,0 con ácido acético. El volumen se ajusta a 1,0 ml mediante la adición de la cantidad residual de agua. La solución se filtra, se introduce en viales con un exceso apropiado y se esteriliza.

### Ejemplo D

25 Pueden elaborarse de un modo convencional cápsulas blandas de gelatina que contienen los siguientes ingredientes:

#### **Contenido de la cápsula**

Compuesto de fórmula (I)	5,0 mg
Cera amarilla	8,0 mg
Aceite de semilla de soja hidrogenado	8,0 mg
Aceites vegetales parcialmente hidrogenados	34,0 mg
Aceite de semilla de soja	110,0 mg
Peso del contenido de la cápsula	165,0 mg

#### **Cápsula de gelatina**

Gelatina	75,0 mg
Glicerol al 85%	32,0 mg
Karion 83	8,0 mg (materia seca)
Dióxido de Titan	0,4 mg
Amarillo óxido de hierro	1,1 mg

30 El ingrediente activo se disuelve en una mezcla de fusión caliente del resto de ingredientes y la mezcla se introduce en cápsulas blandas de gelatina del tamaño apropiado. Las cápsulas blandas de gelatina rellenas se tratan según los procedimientos usuales.

### Ejemplo E

35 Pueden elaborarse de un modo convencional sobres que contienen los siguientes ingredientes:

Compuesto de fórmula (I)	50,0 mg
Lactosa, polvo fino	1015,0 mg

Celulosa microcristalina (AVICEL PH 102)	1400,0 mg
Carboximetil celulosa sódica	14,0 mg
Polivinilpirrolidona K 30	10,0 mg
Estearato magnésico	10,0 mg
Aditivos aromatizantes	1,0 mg

El ingrediente activo se mezcla con lactosa, celulosa microcristalina y carboximetil celulosa sódica y se granuló con una mezcla de polivinilpirrolidona en agua. El granulado se mezcla con estearato magnésico y los aditivos aromatizantes y se introduce en sobres.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
 <120> AGONISTAS DEL RECEPTOR DEL NEUROPEPTIDO-2 (Y-2R) Y LA UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS  
 <130> 23353  
 <140>  
 <141>  
 <150> 60/748.071  
 15 <151> 2005-12-07  
 <160> 41  
 <170> PatentIn Ver. 3.3  
 <210> 1  
 <211> 34  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético  
 <400> 1  
 25 Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln  
 20 25 30  
 30 Arg Tyr  
 <210> 2  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <400> 2  
 45 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 3  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 3

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

20 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> m-Tyr  
 <400> 4

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 25 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

35 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

40 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

45 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 3-yodo-Tyr  
 <400> 5

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

50 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

65 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 3,5 di F-Tyr

<400> 6

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

5  
 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)

15  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg

20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 2,6 di F-Tyr  
 <400> 7

25  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

30  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

40  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

45  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 2,6 di Me-Tyr  
 <400> 8

50  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

55  
 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

60  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

65  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (15)  
 <223> 4-metoxi-Phe  
 <400> 9

5 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

<210> 10  
 <211> 15  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

20 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 10

25 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

<210> 11  
 <211> 15  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

35 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

40 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

45 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 4-amino-Phe  
 <400> 11

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

50 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

65 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 4 F-Phe



<400> 12

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

5

<210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)

15

<223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 4(CH<sub>2</sub>OH)-Phe  
 <400> 13

25

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

30

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

40

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

45

<222> (15)  
 <223> 4-trifluoro metil-Phe  
 <400> 14

50

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

55

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

60

<222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)

65

<223> (NMe)Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (15)  
 <223> 3 F-Phe  
 <400> 15

5 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 15

10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

20 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>

25 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 2,3,4,5,6 Penta F-Phe  
 <400> 16

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

30 <210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 40 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 45 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 3,4 dicloro-Phe  
 <400> 17

50 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Phe  
 1 5 10 15

55 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

65 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> Cha  
 <400> 18  
 5

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Xaa  
 1 5 10 15

10 <210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 19  
 25

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Trp  
 1 5 10 15

30 <210> 20  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (15)  
 <223> 1-Nal  
 <400> 20

50 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Xaa  
 1 5 10 15

<210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 65 <223> (NMe)Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (15)  
 <223> 2-Nal  
 <400> 21

5 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Xaa  
 1 5 10 15

<210> 22  
 <211> 15  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 20 <222> (15)  
 <223> (C-alfa-metil)-Tyr  
 <400> 22

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 25 1 5 10 15

<210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 35 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 40 <223> (NMe)Arg  
 <400> 23

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 45 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 55 <223> Nle  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 24

65 Ile Xaa Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (1)  
 <223> Ac-Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 15 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)  
 <223> 2,6 difluoro-Tyr  
 <400> 25  
 25  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 26  
 30 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Ac-Ile  
 <220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 26  
 50  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (1)  
 <223> Pentoil-Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 65 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 27

5 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 15  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Trimetilacetil-Ile  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 20 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 25 <223> (NMe)Arg  
 <400> 28

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

30 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 40 <223> Ciclohexilacetil-Ile  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 45 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 29

50 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

<210> 30  
 55 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Benzoil-Ile  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 5 <400> 30  
  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
  
 10 <210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Adamantoil-Ile  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 25 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 31  
  
 30 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 32  
 <211> 15  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 32  
  
 50 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (2)  
 <223> Lys(PEG-30.000 SPA)  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 65 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 33

5 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

<210> 34  
 <211> 15  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

15 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 20 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 34

25 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

<210> 35  
 <211> 15  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 35 <222> (2)  
 <223> Lys(PEG-40.000 BTC)  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 40 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 45 <400> 35

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

50 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 <223> Nle  
 60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 65 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg



<400> 36

Ile Xaa Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

5

<210> 37  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

15

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 <223> Nle  
 <220>

20

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

25

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 37

Ile Xaa Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

30

<210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

35

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

40

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Ac-Ile  
 <220>

45

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 <223> Lys(PEG-30.000 SPA)  
 <220>

50

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 38

Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15

55

<210> 39  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>

65

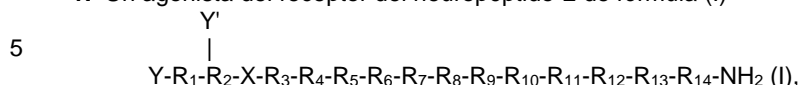
<221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 <223> Ac-Ile  
 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)  
 <223> Lys(PEG-30.000 SSA)  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 10 <223> (NMe)Arg  
 <400> 39  
  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 15  
 <210> 40  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)  
 25 <223> Fmoc-Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> (NMe)Arg  
 <400> 40  
 35  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 <210> 41  
 <211> 15  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 <220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 <223> Lys(PEG-30.000 SSA)  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (3)  
 <223> Pqa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 55 <223> (NMe)Arg  
 <400> 41  
  
 Ile Lys Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr Arg Gln Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 60

## REIVINDICACIONES

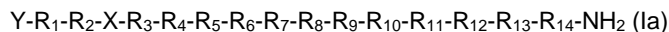
1. Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de fórmula (I)



en donde:

- 10 X es ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolina-acético (Pqa),  
 Y es H, una porción acilo, un alquilo sustituido o no sustituido, un alquilo inferior sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alcoxi sustituido o no sustituido, una porción poli(etilen)glicol, PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC,  
 Y' es H, una porción poli(etilen)glicol, PEGm-SSA, PEGm-β-SBA, PEGm-SPA o PEGm-BTC,
- 15 R<sub>1</sub> es Ile, Ala, (D)Ile, N-metil Ile, Aib, 1-1Aic, 2-2Aic, Ach o Acp,  
 R<sub>2</sub> es Lys, Ala, (D)Lys, NMelys, Nle o (Lys-Gly),  
 R<sub>3</sub> es Arg, Ala, (D)Arg, N-metil Arg, Phe, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>4</sub> es His, Ala, (D)His, N-metil His, 4-MeOApC, 3-Pal o 4-Pal,  
 R<sub>5</sub> es Tyr, Ala, (D)Tyr, N-metil Tyr, Trp, Tic, Bip, Dip, (1)Nal, (2)Nal, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,
- 20 R<sub>6</sub> es Leu, Ala, (D)Leu o N-metil Leu,  
 R<sub>7</sub> es Asn, Ala o (D)Asn,  
 R<sub>8</sub> es Leu o Trp,  
 R<sub>9</sub> es Val, Ala, (D)Val o N-metil Val,  
 R<sub>10</sub> es Thr, Ala o N-metil Thr,
- 25 R<sub>11</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>12</sub> es Gln o Ala,  
 R<sub>13</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>14</sub> es Tyr, (D)Tyr o N-metil Tyr, Tyr-modificada, Phe, Phe-modificada, Cha, (1)Nal, (2)Nal, C-alfa-metil Tyr o Trp, y  
 PEGm tiene de 1 a 60 KDa,
- 30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 en donde  
 el término "alquilo", significa un radical hidrocarbilo ramificado o no ramificado, cíclico o no cíclico, saturado o insaturado en donde dicho alquilo cíclico es C<sub>3</sub> a C<sub>12</sub>, y en donde dicho alquilo no cíclico es C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>,  
 el término "alquilo inferior" significa un radical hidrocarbilo ramificado o no ramificado, cíclico o no cíclico, saturado o insaturado en donde dicho grupo de alquilo inferior cíclico es C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> o C<sub>7</sub>, y en donde dicho grupo de alquilo inferior no cíclico es C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub>;  
 el término "alcoxi" significa alquilo-O-;  
 el término "arilo" significa fenilo o naftilo; y  
 el término "heteroarilo" significa un radical monocíclico o bicíclico de 5 a 12 átomos de anillo que tiene por lo menos un anillo aromático conteniendo uno, dos o tres heteroátomos de anillo elegidos entre N, O y S, siendo los átomos de anillo restantes C, con el entendimiento de que el punto de unión del radical heteroarilo estará en un anillo aromático y uno o dos átomos de carbono de anillo del grupo heteroarilo pueden estar sustituidos por un grupo carbonilo.

45 2. Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por la fórmula (Ia)



en donde:

- 50 X es ácido N-piperazin-1-il-4(3H)-quinazolinona-3-acético (Pqa),  
 Y es H, una porción acilo, un alquilo sustituido o no sustituido, un alquilo inferior sustituido o no sustituido, un arilo sustituido o no sustituido, un alcoxi sustituido o no sustituido, una porción poli(etilen)glicol, PEG-SSA, PEG-β-SBA, PEG-SPA o PEG-BTC,
- 55 R<sub>1</sub> es Ile, Ala, (D)Ile, N-metil Ile, Aib, 1-1Aic, 2-2Aic, Ach o Acp,  
 R<sub>2</sub> es Lys, Ala, (D)Lys, NMelys, Nle o (Lys-Gly),  
 R<sub>3</sub> es Arg, Ala, (D)Arg, N-metil Arg, Phe, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,  
 R<sub>4</sub> es His, Ala, (D)His, N-metil His, 4-MeOApC, 3-Pal o 4-Pal,  
 R<sub>5</sub> es Tyr, Ala, (D)Tyr, N-metil Tyr, Trp, Tic, Bip, Dip, (1)Nal, (2)Nal, 3,4,5-trifluoro Phe o 2,3,4,5,6-pentafluoro Phe,
- 60 R<sub>6</sub> es Leu, Ala, (D)Leu o N-metil Leu,  
 R<sub>7</sub> es Asn, Ala o (D)Asn,  
 R<sub>8</sub> es Leu o Trp,  
 R<sub>9</sub> es Val, Ala, (D)Val o N-metil Val,  
 R<sub>10</sub> es Thr, Ala o N-metil Thr,
- 65 R<sub>11</sub> es Arg, (D) Arg o N-metil Arg,  
 R<sub>12</sub> es Gln o Ala,  
 R<sub>13</sub> es Arg, (D)Arg o N-metil Arg, y



- 5 Pentil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Trimetilacetil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Ciclohexil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Benzoil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Adamantil-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 30.000 SPA)IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 40.000 BTC)-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 30.000)-SSA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 (PEG 30.000)-beta-SBA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 10 Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SPA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY y  
 IK(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY,  
 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 15 **14.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)R(2,6-di F)Y.
- 15.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es Ac-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.
- 20 **16.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es (PEG 30.000)-SPA-IK-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.
- 17.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es (PEG 30.000)-SSA-INle-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.
- 25 **18.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es Ac-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.
- 30 **19.** Un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, en el que dicho agonista es H-Ile-Lys(PEG 30.000 SSA)-Pqa-RHYLNWVTRQ(N-metil)RY.
- 20.** Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 19, y un transportador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 35 **21.** El agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 19 para su utilización como sustancia terapéutica activa.
- 40 **22.** La utilización de un agonista del receptor del neuropéptido-2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 19 para la preparación de medicamentos para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia, desajustes de glucosa en ayunas y problemas de tolerancia a la glucosa.

FIGURA 1

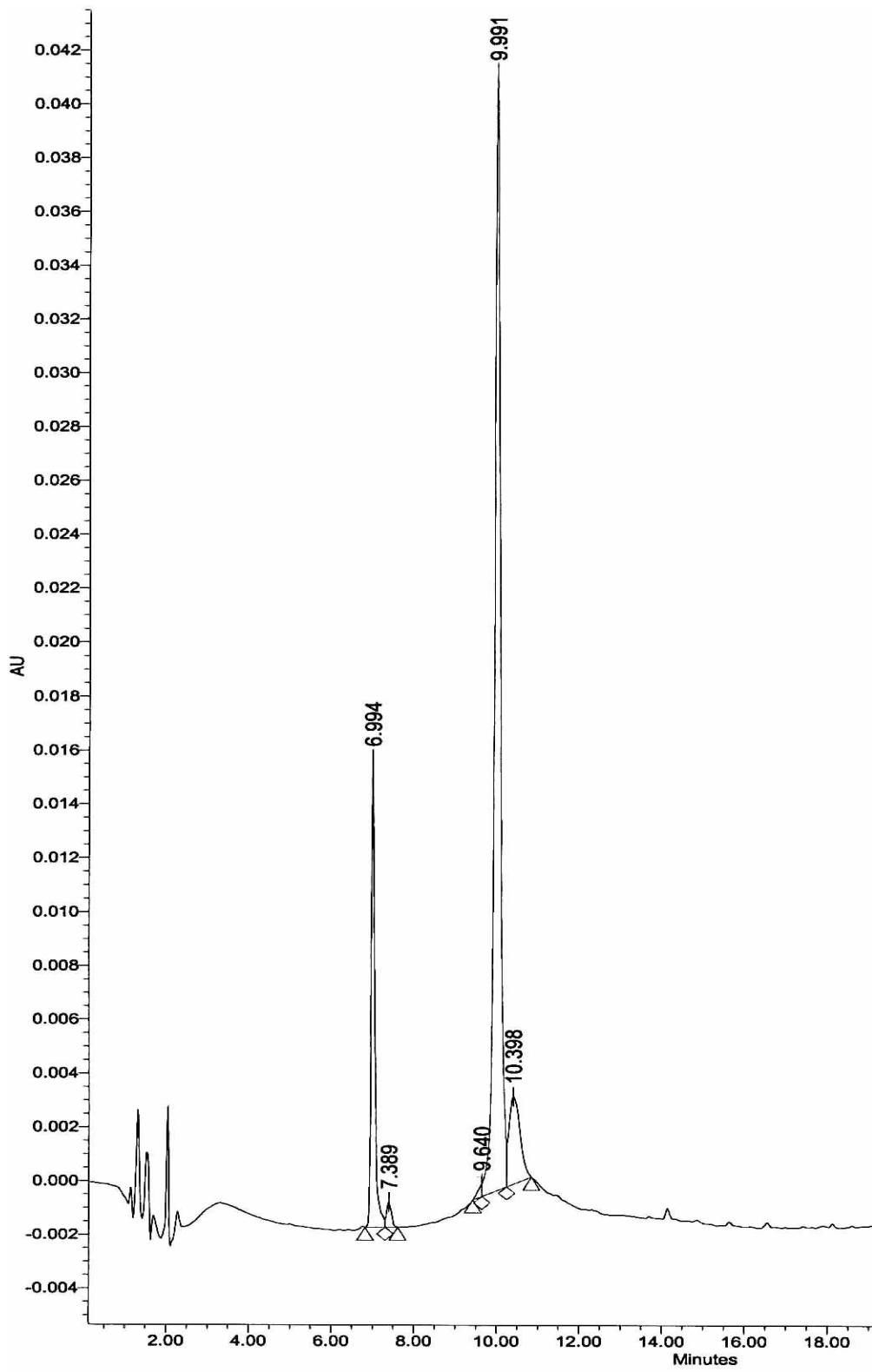


FIGURA 2

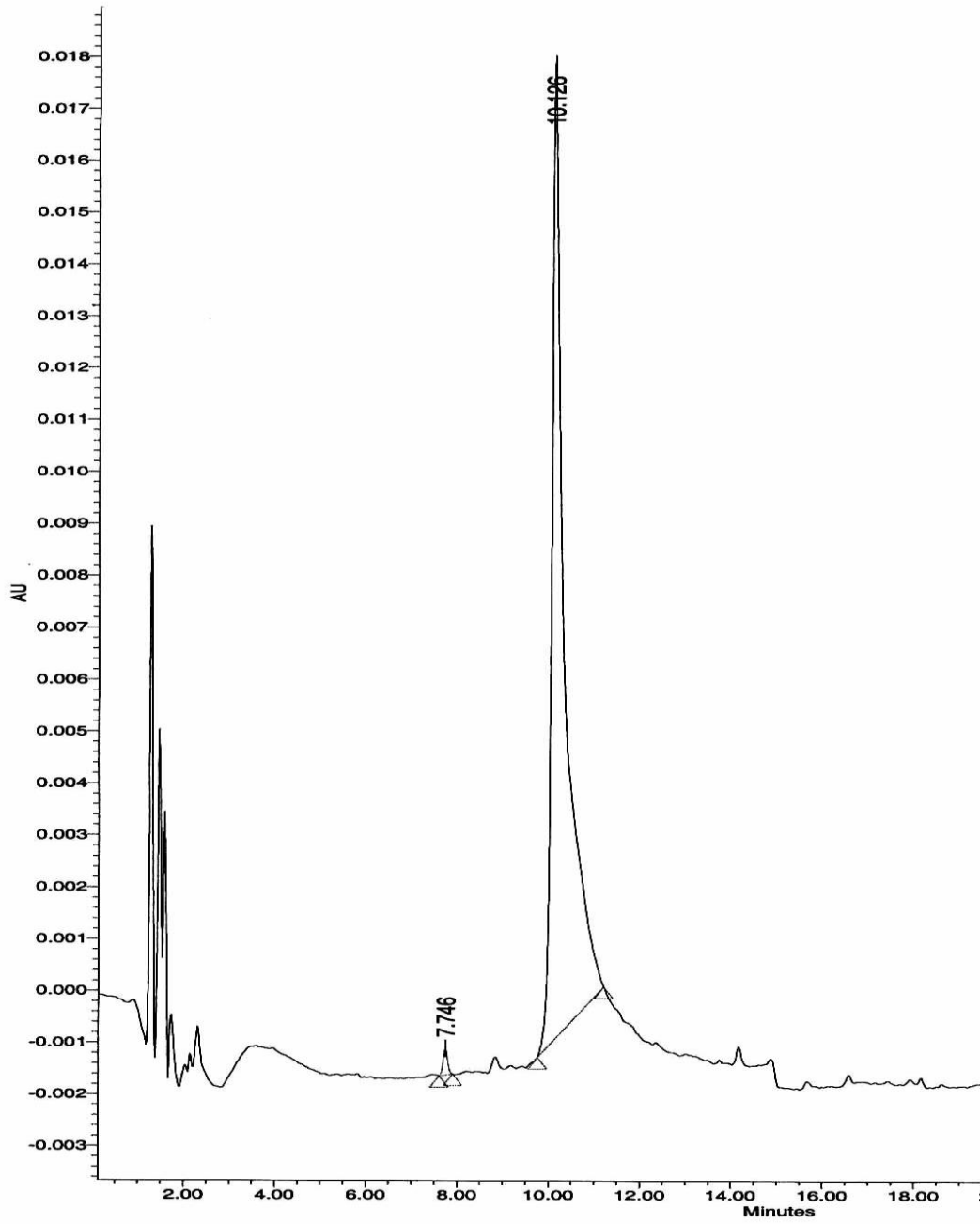


FIGURA 3

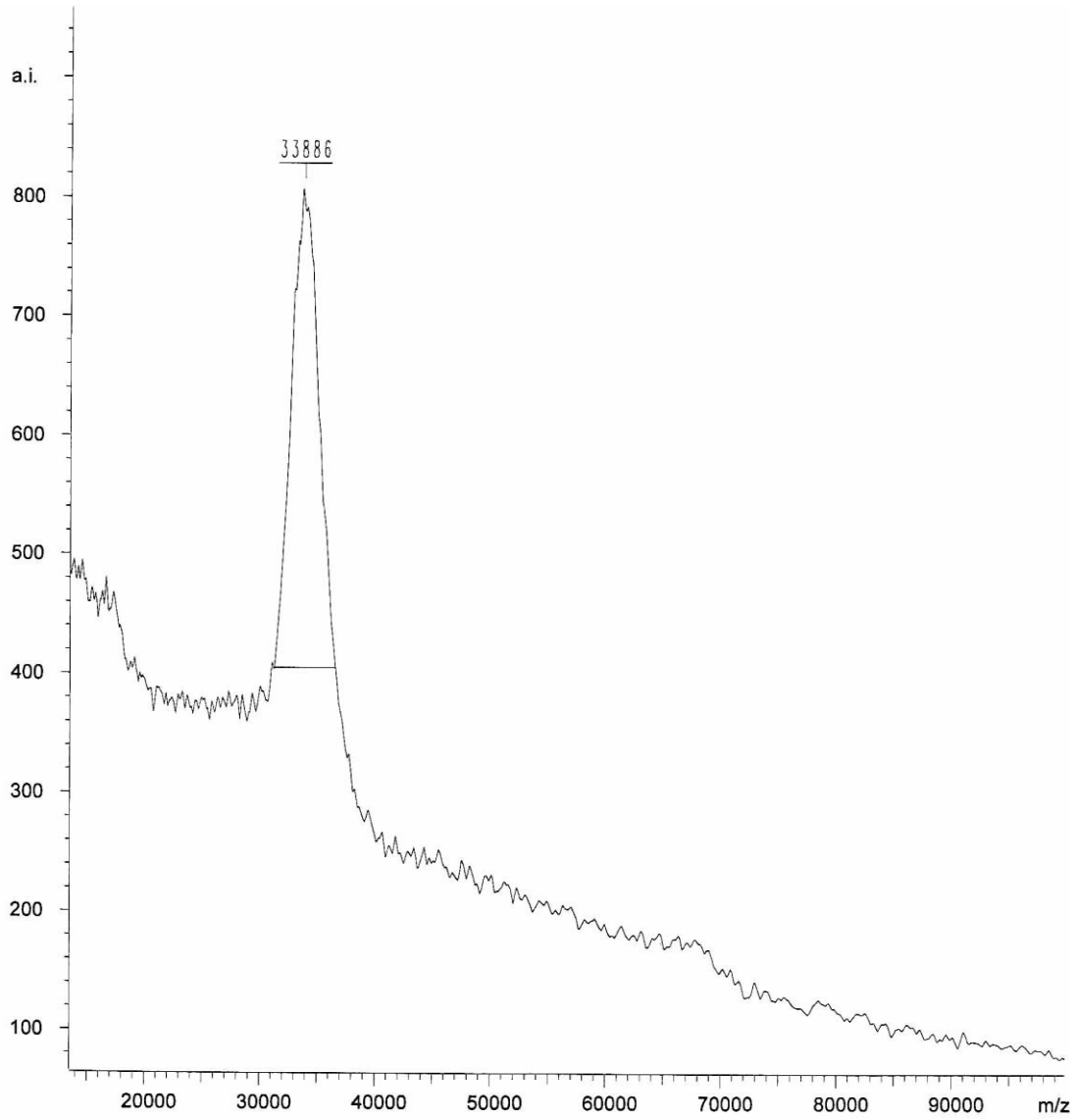




FIGURA 4

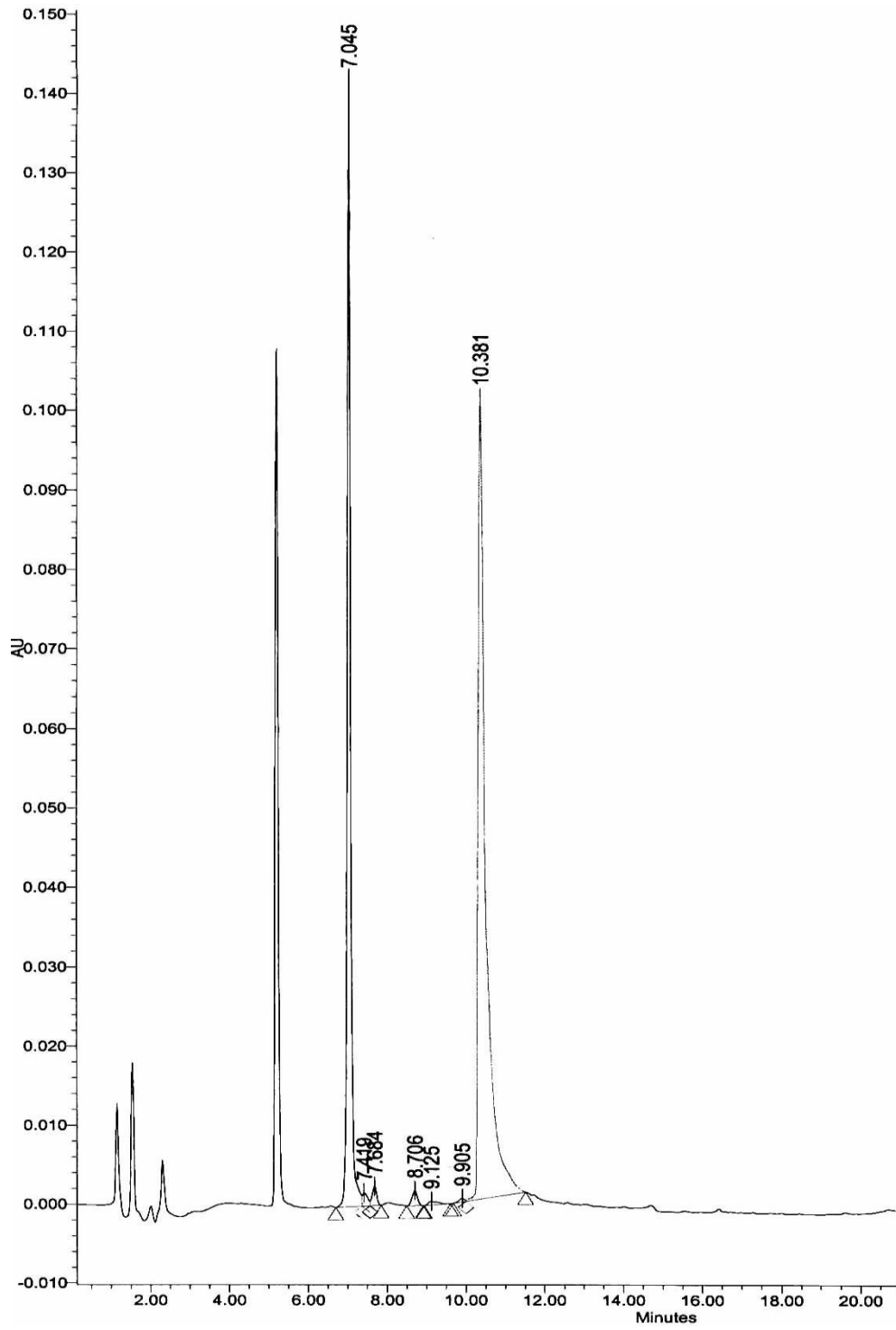


FIGURA 5

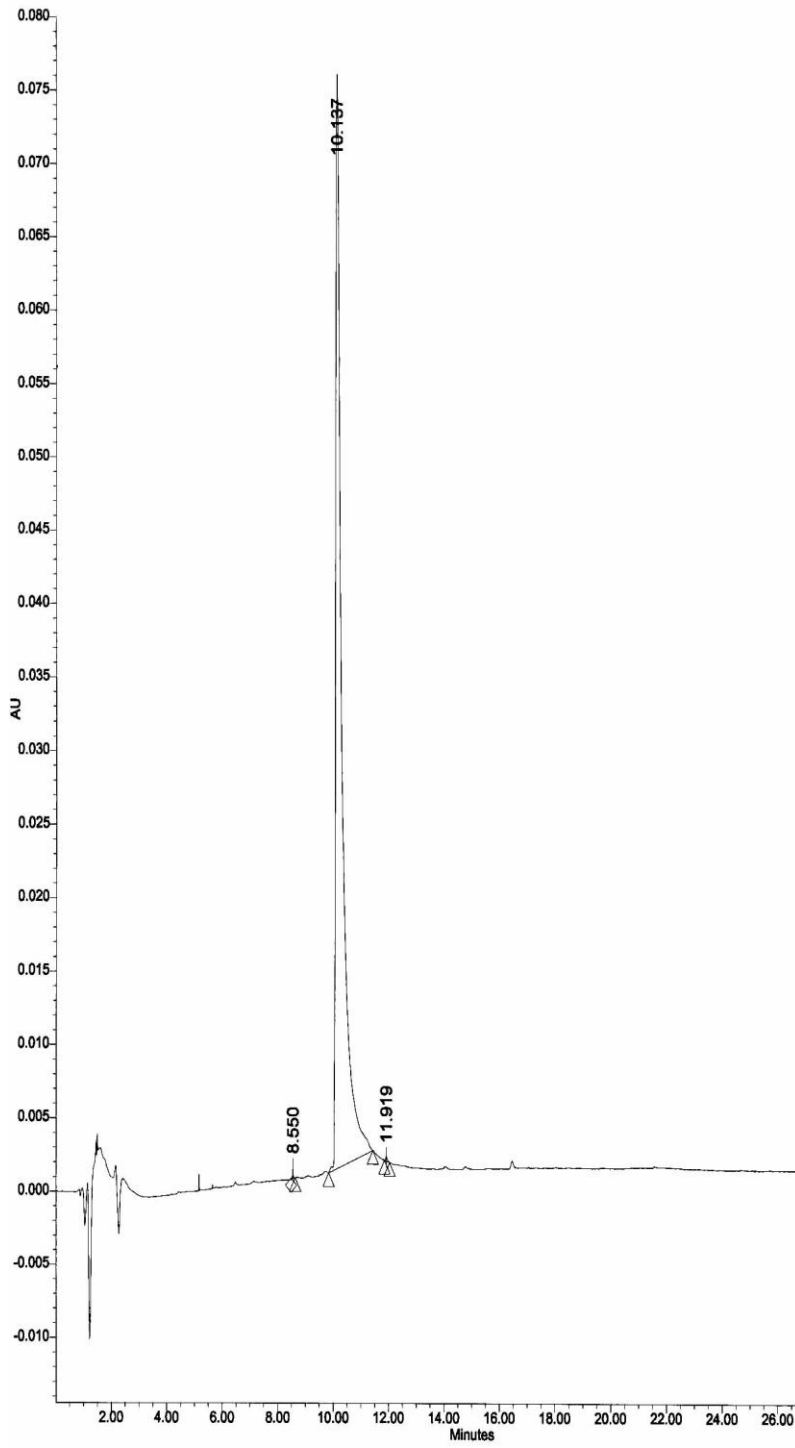


FIGURA 6

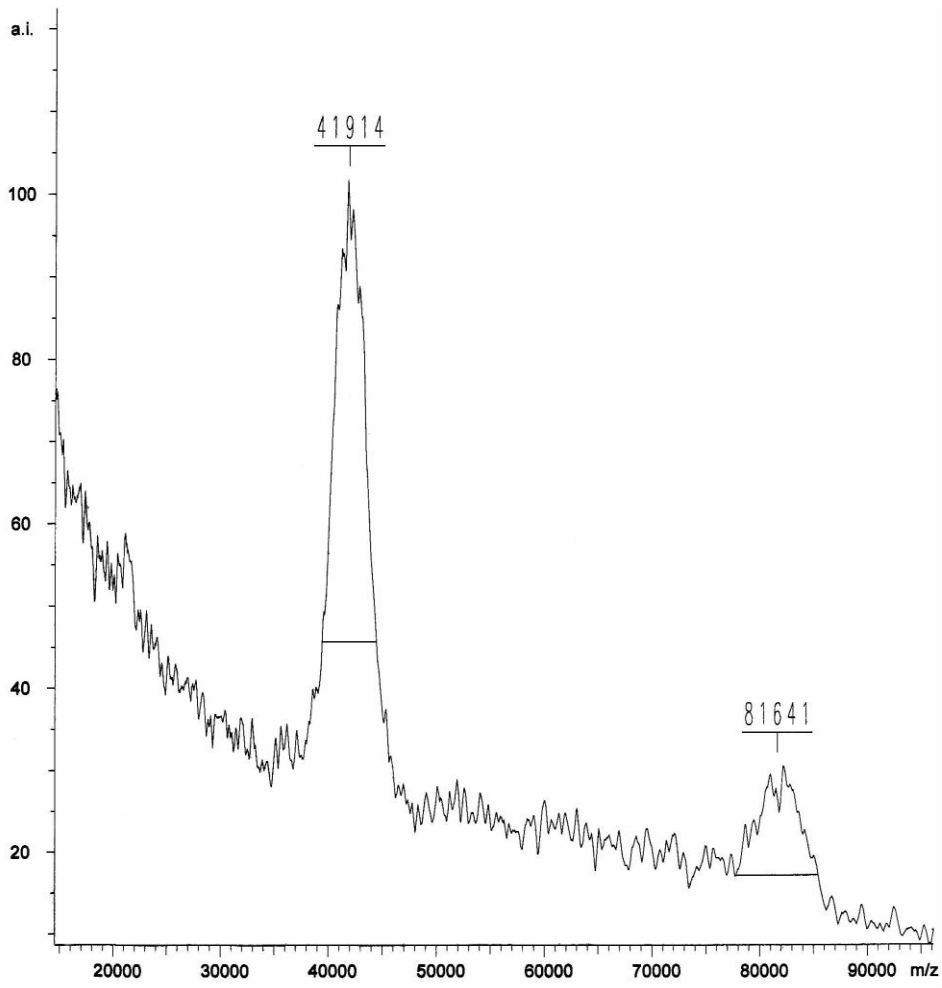


FIGURA 7

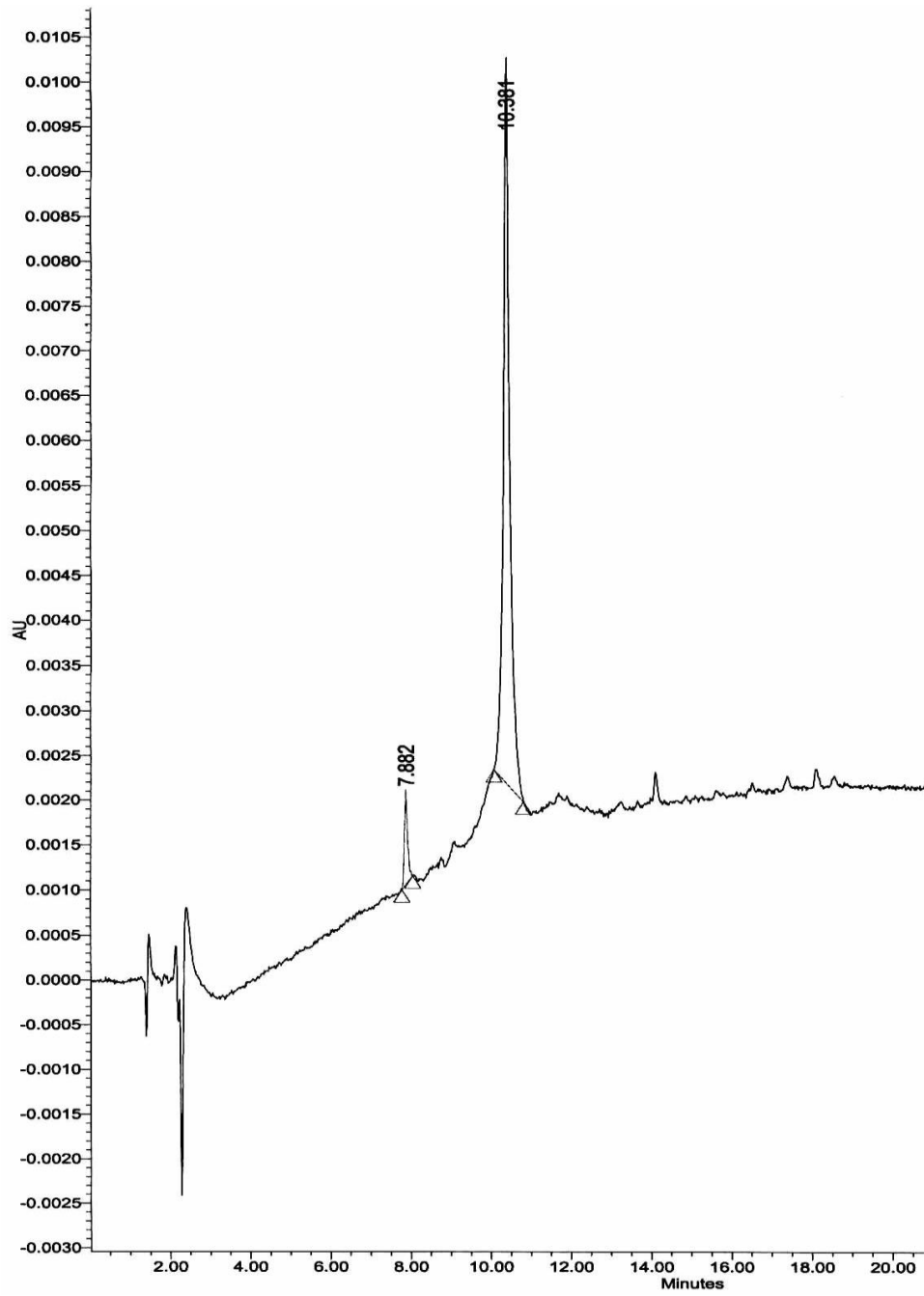


FIGURA 8

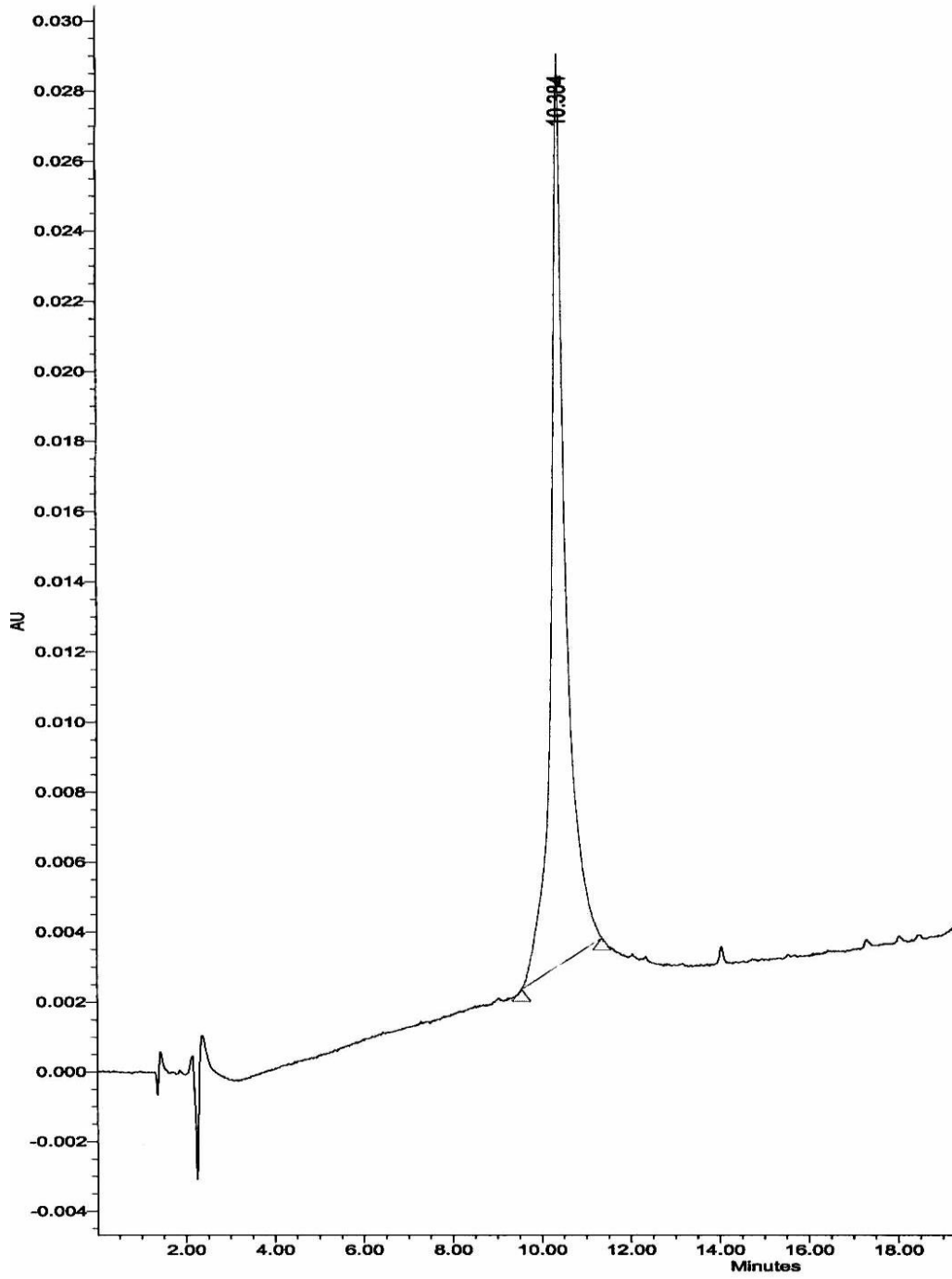


FIGURA 9

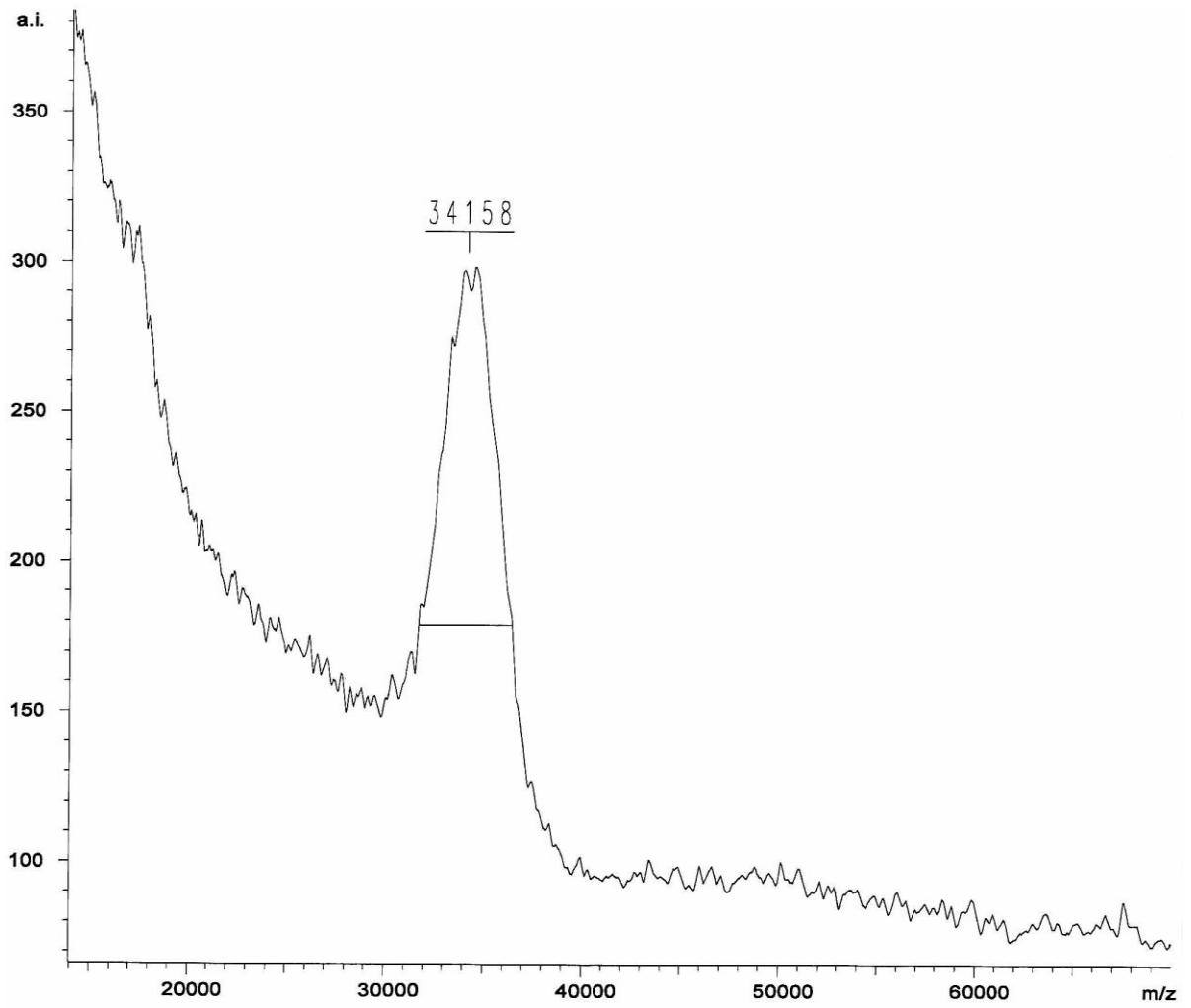


FIGURA 10

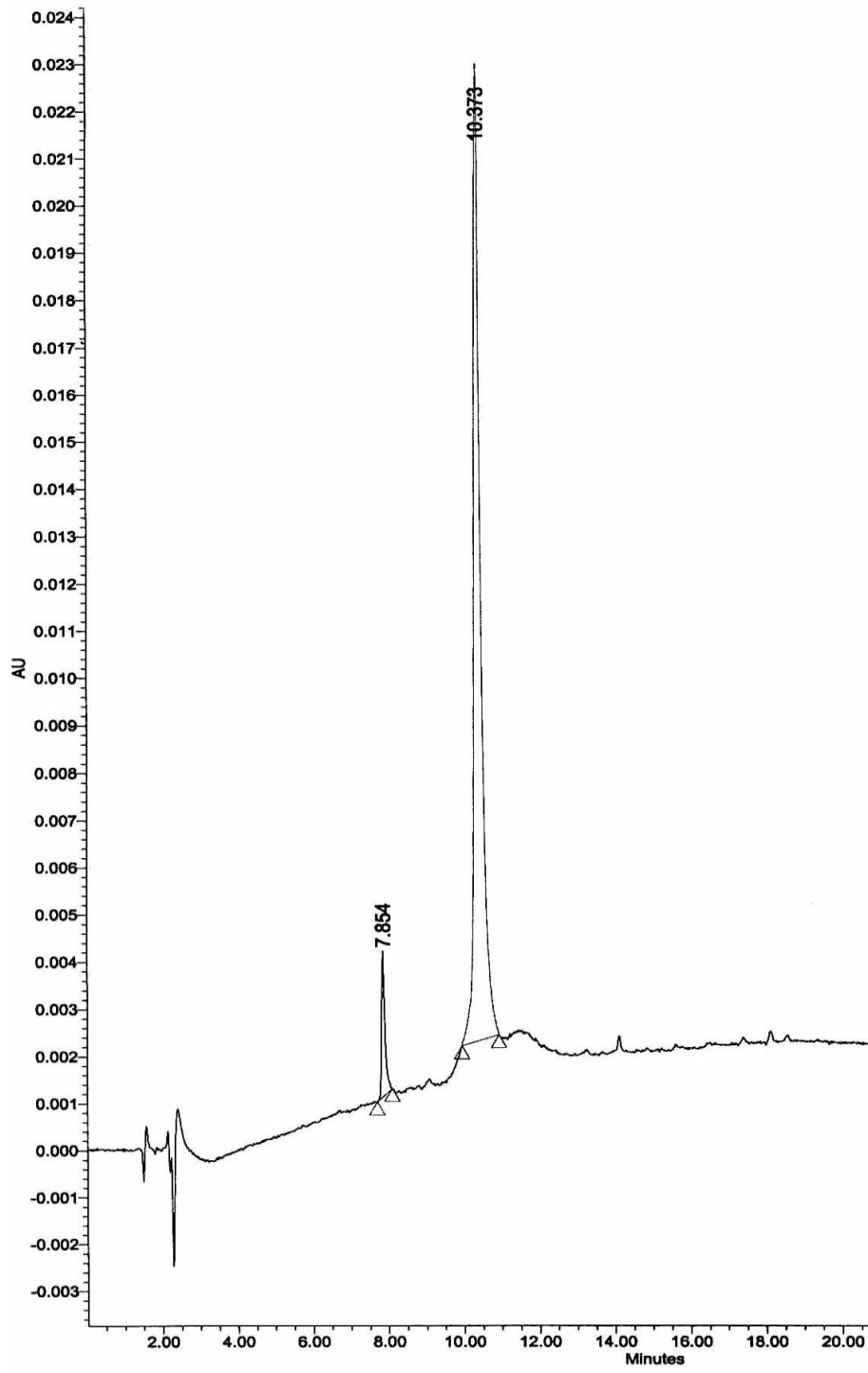


FIGURA 11

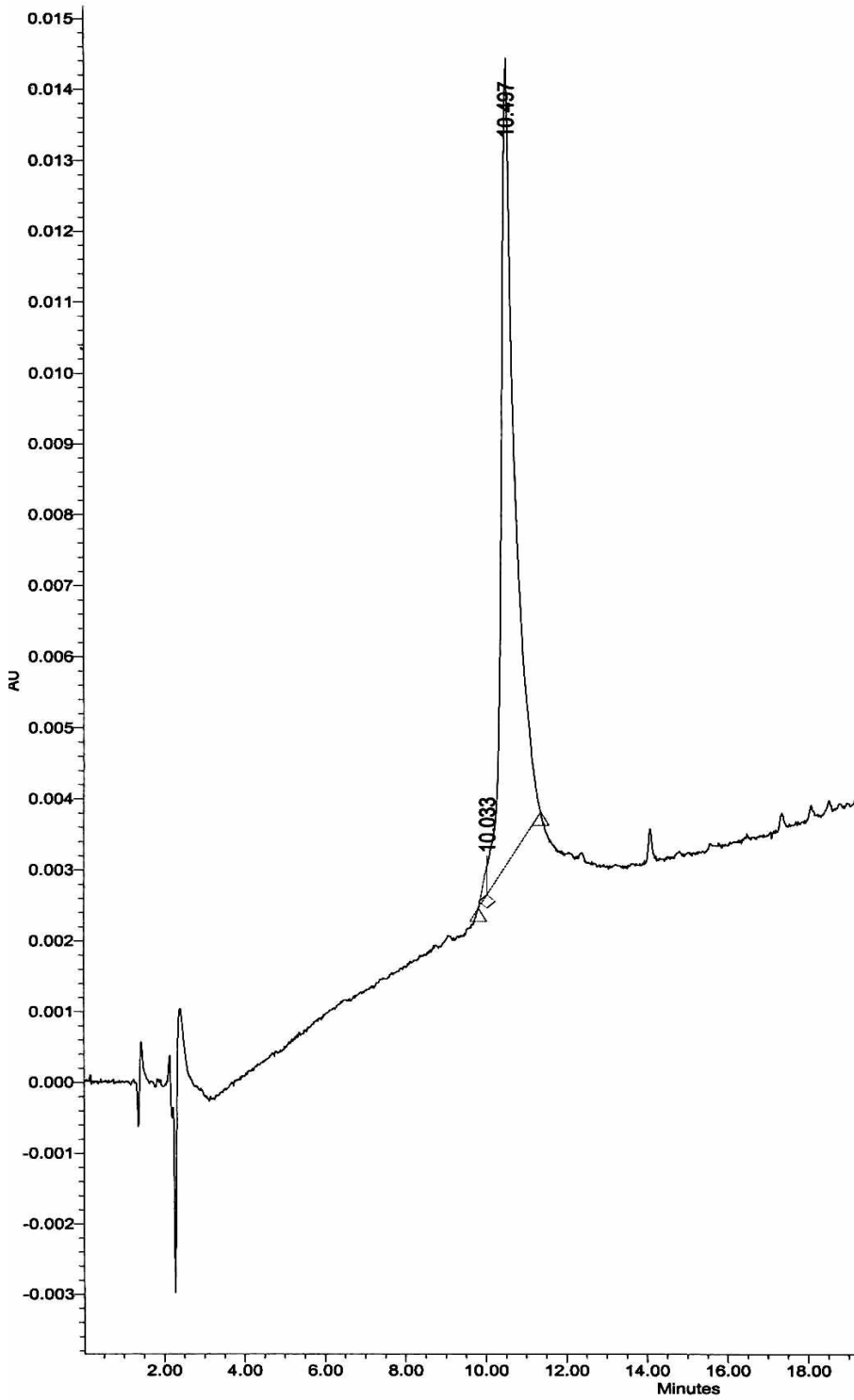




FIGURA 12

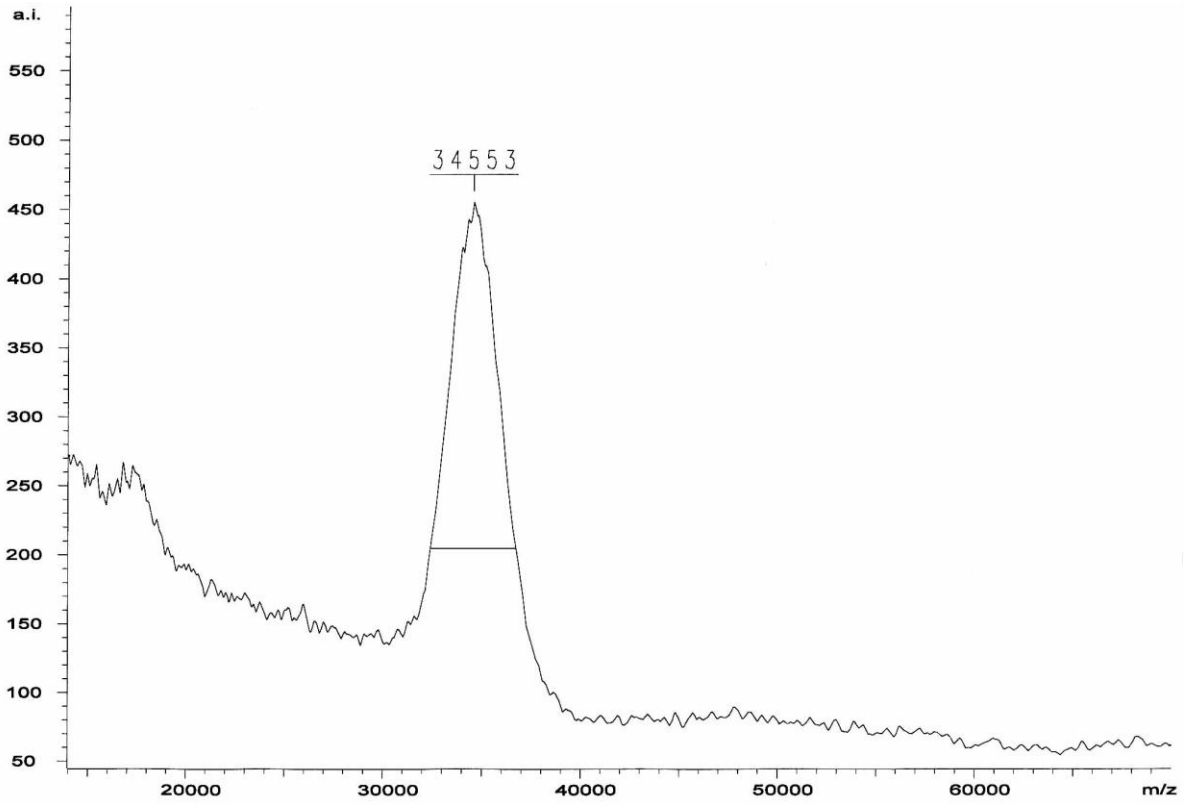


FIGURA 13

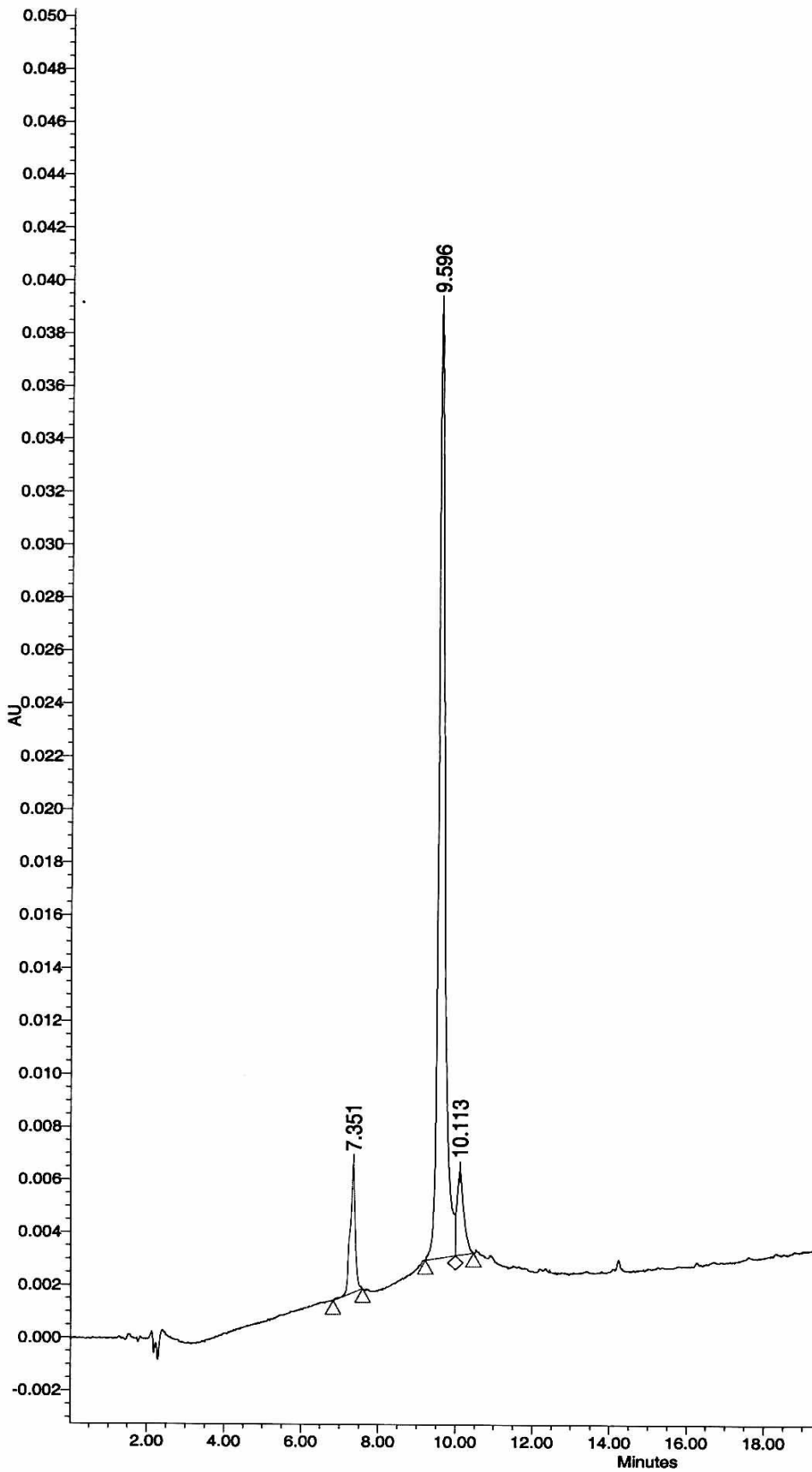


FIGURA 14

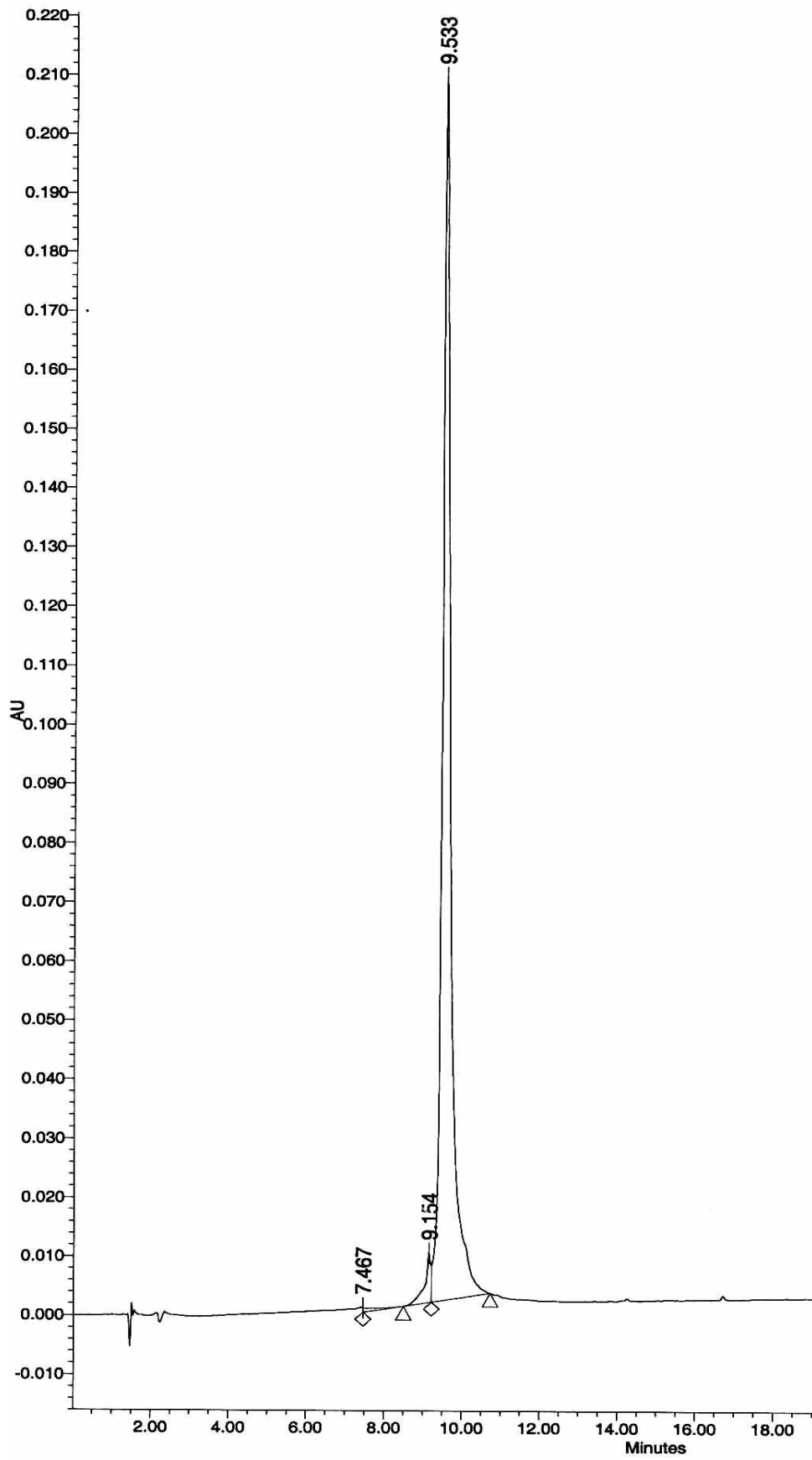


FIGURA 15

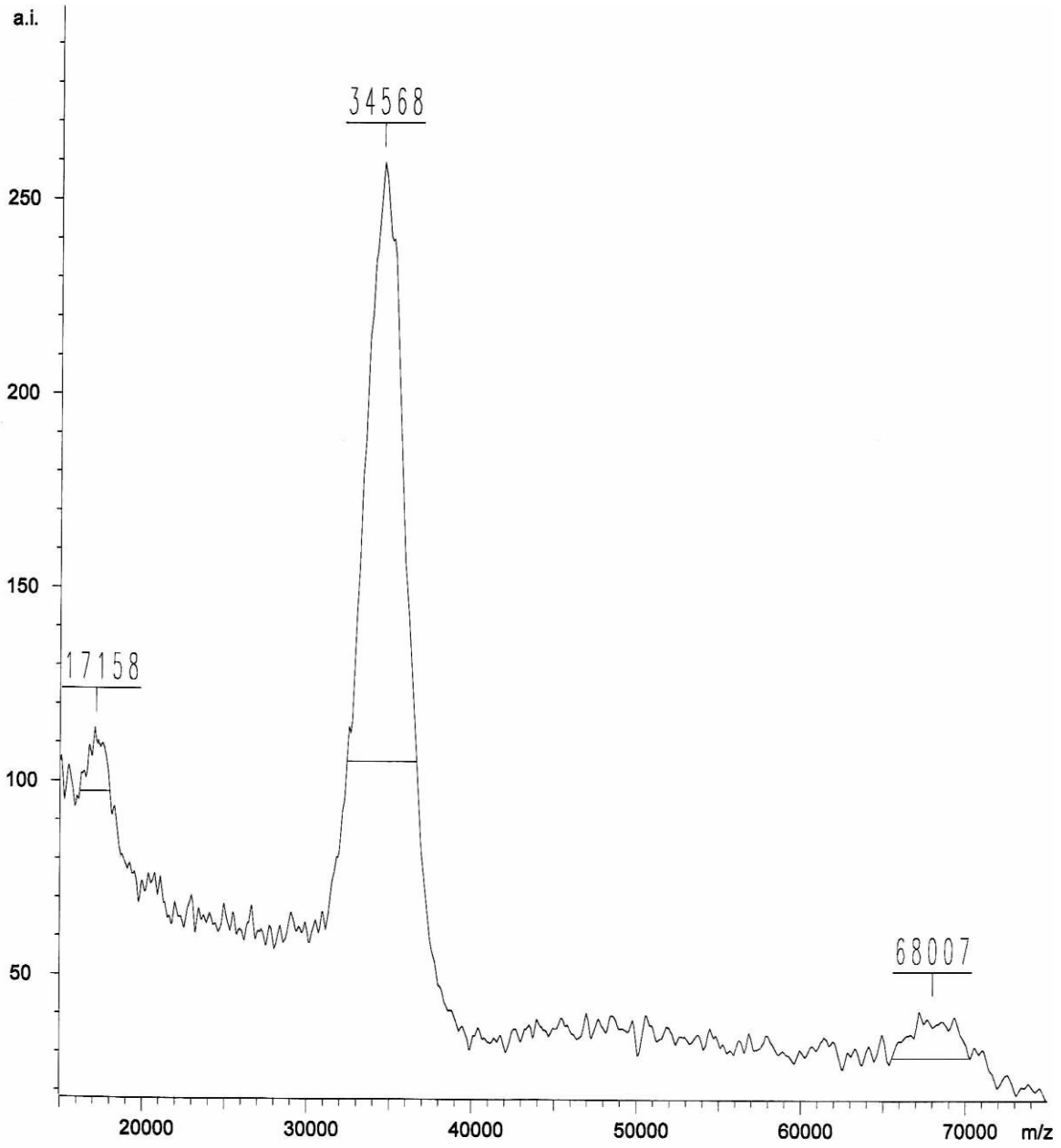


FIGURA 16

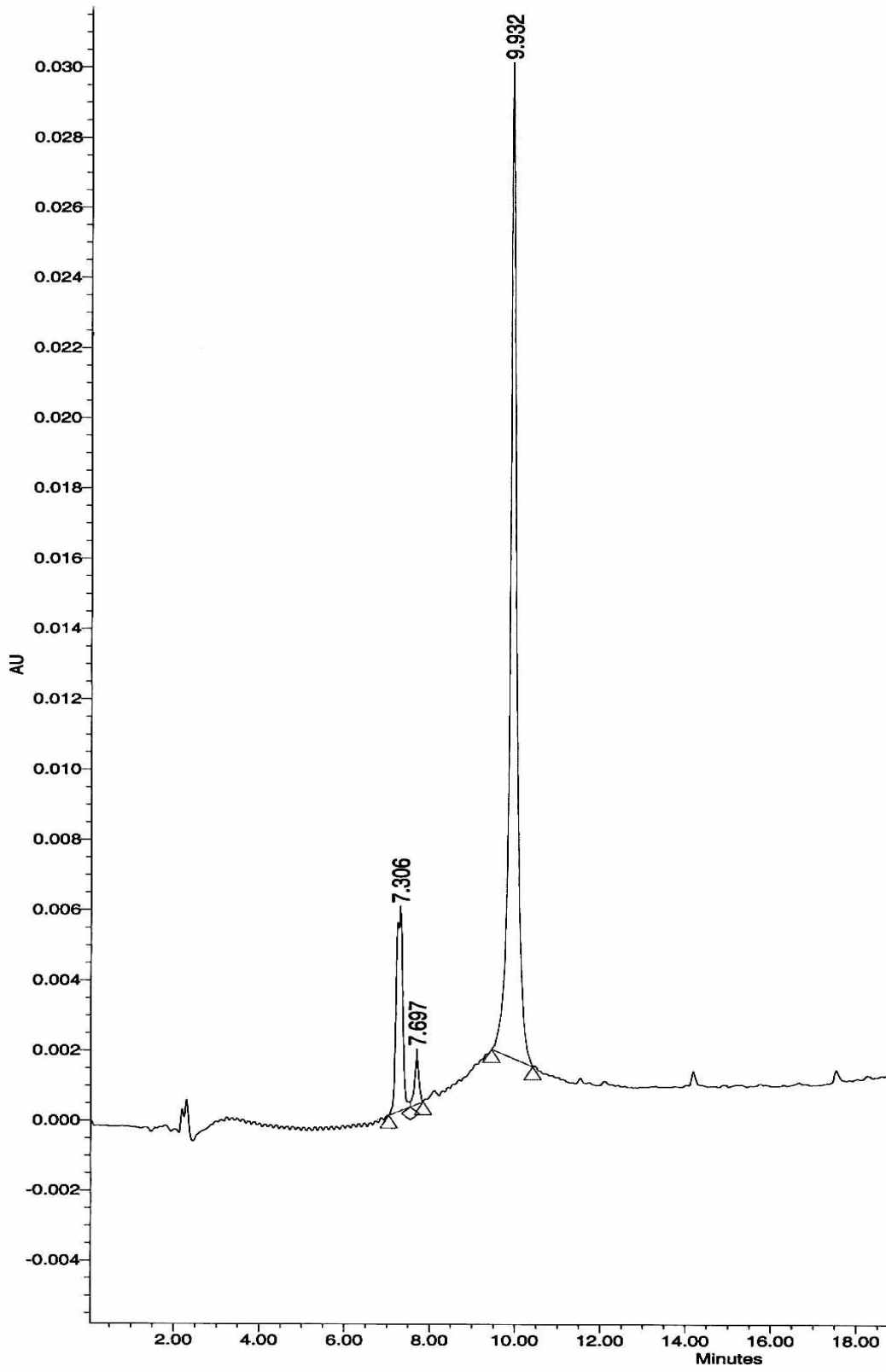


FIGURA 17

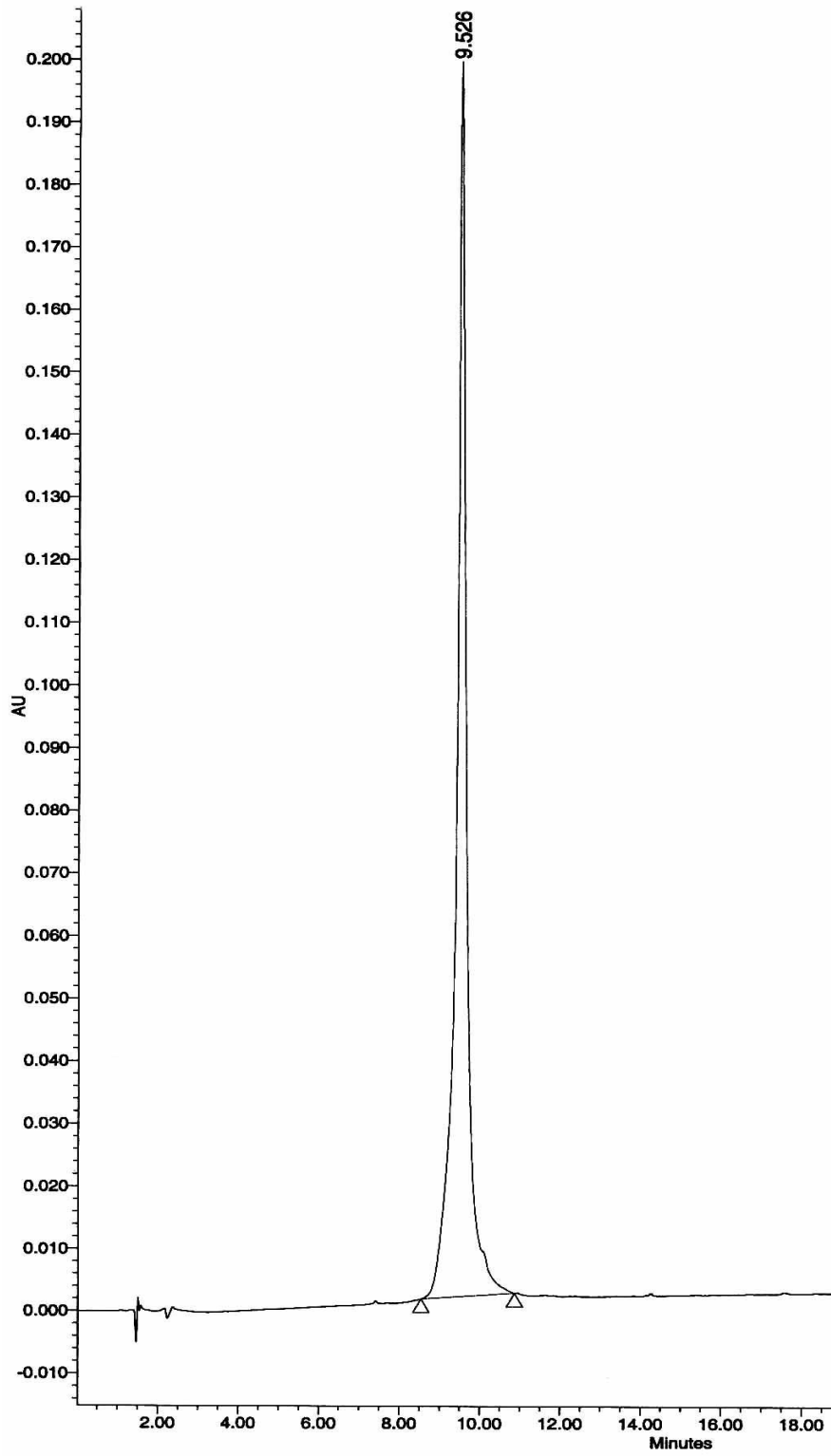


FIGURA 18

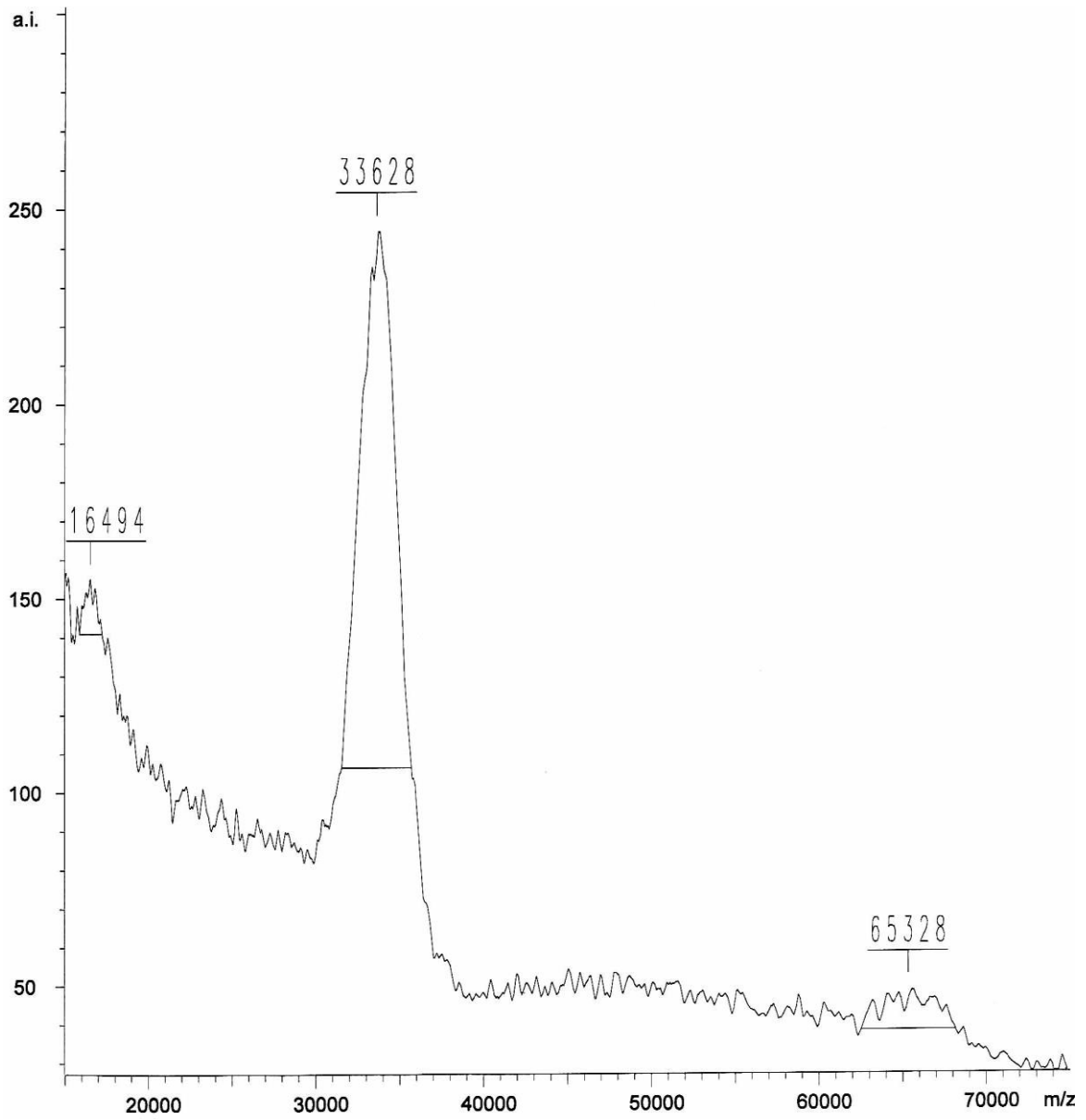


FIGURA 19

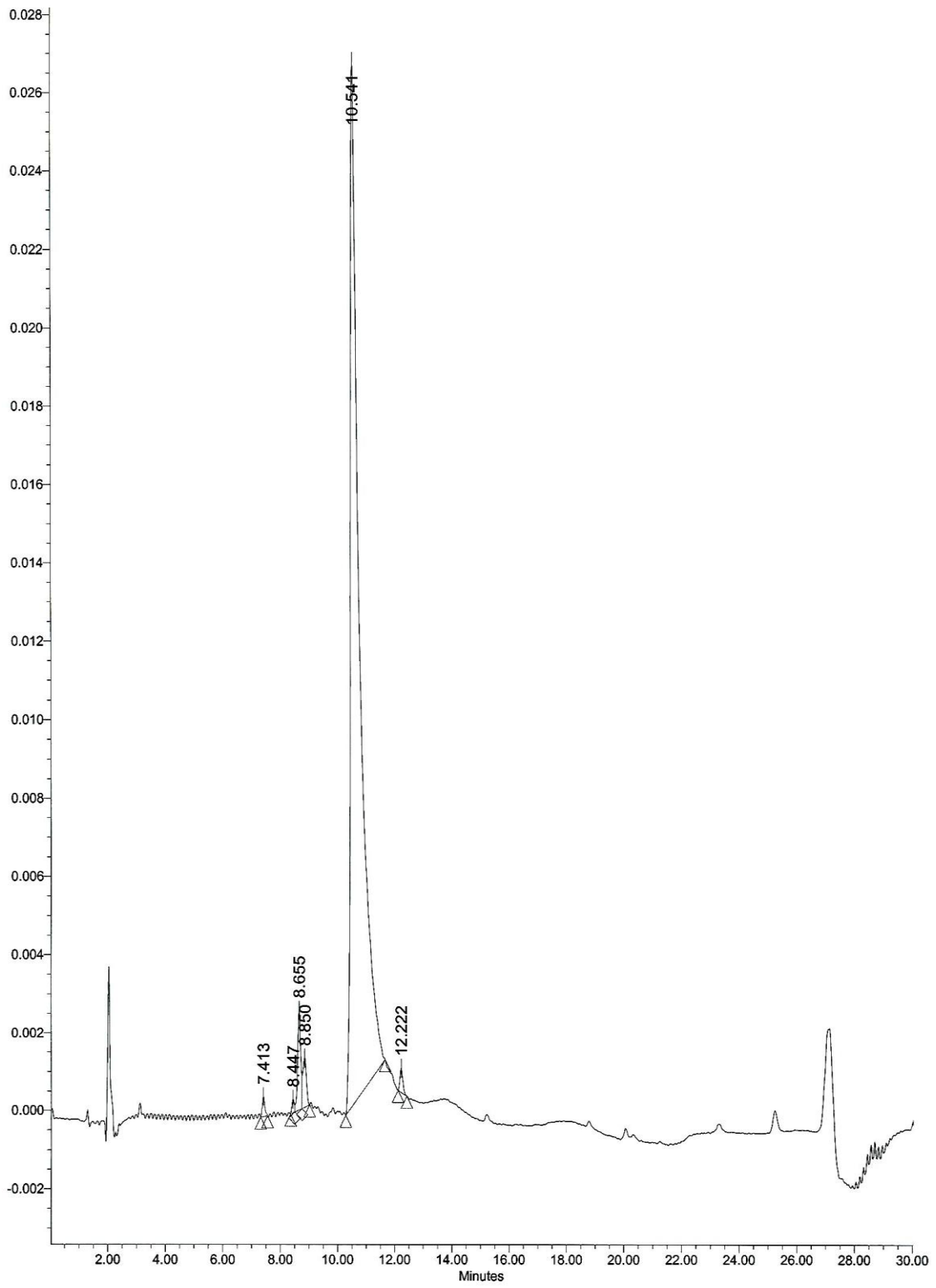




FIGURA 20

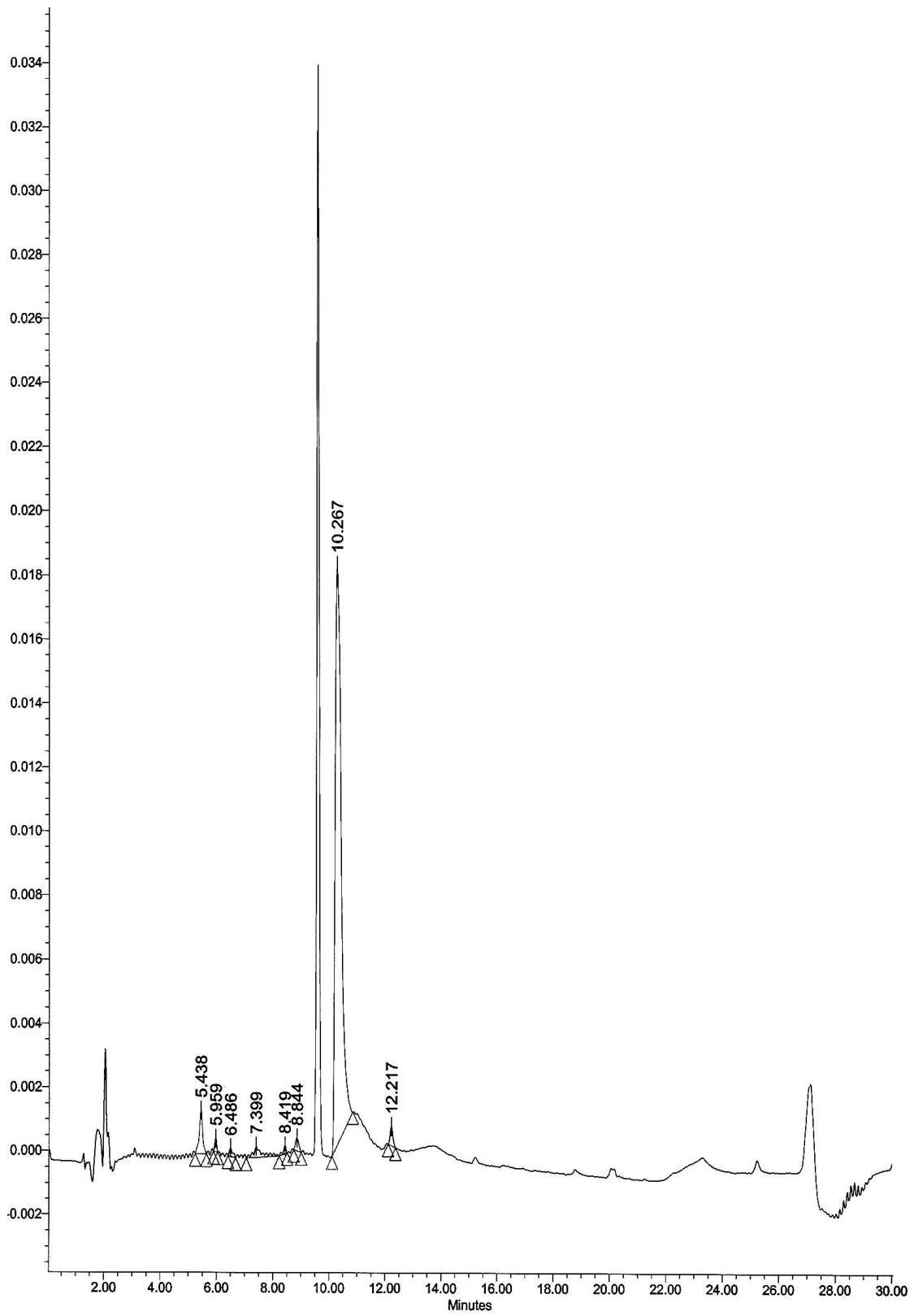


FIGURA 21

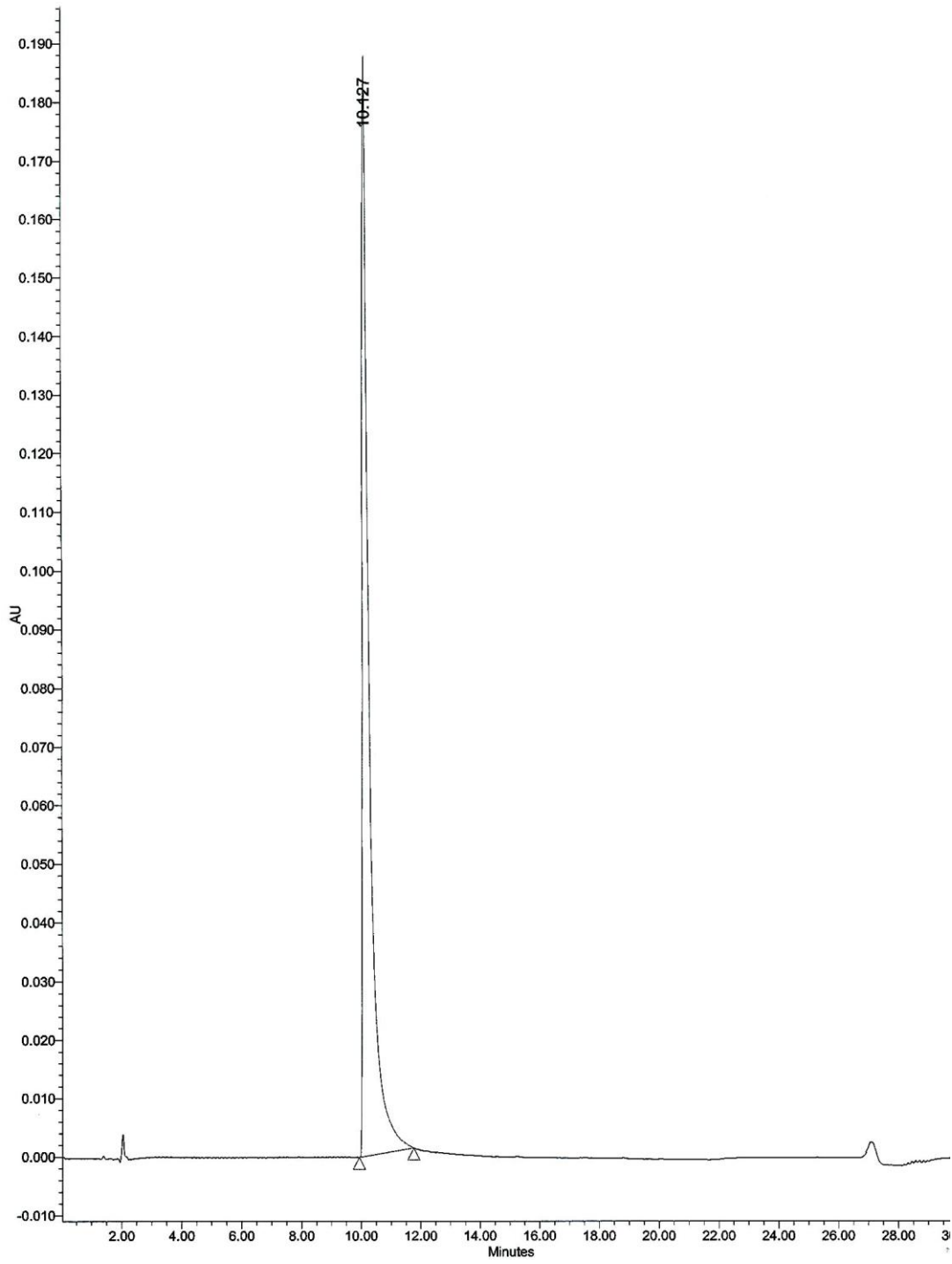


FIGURA 22

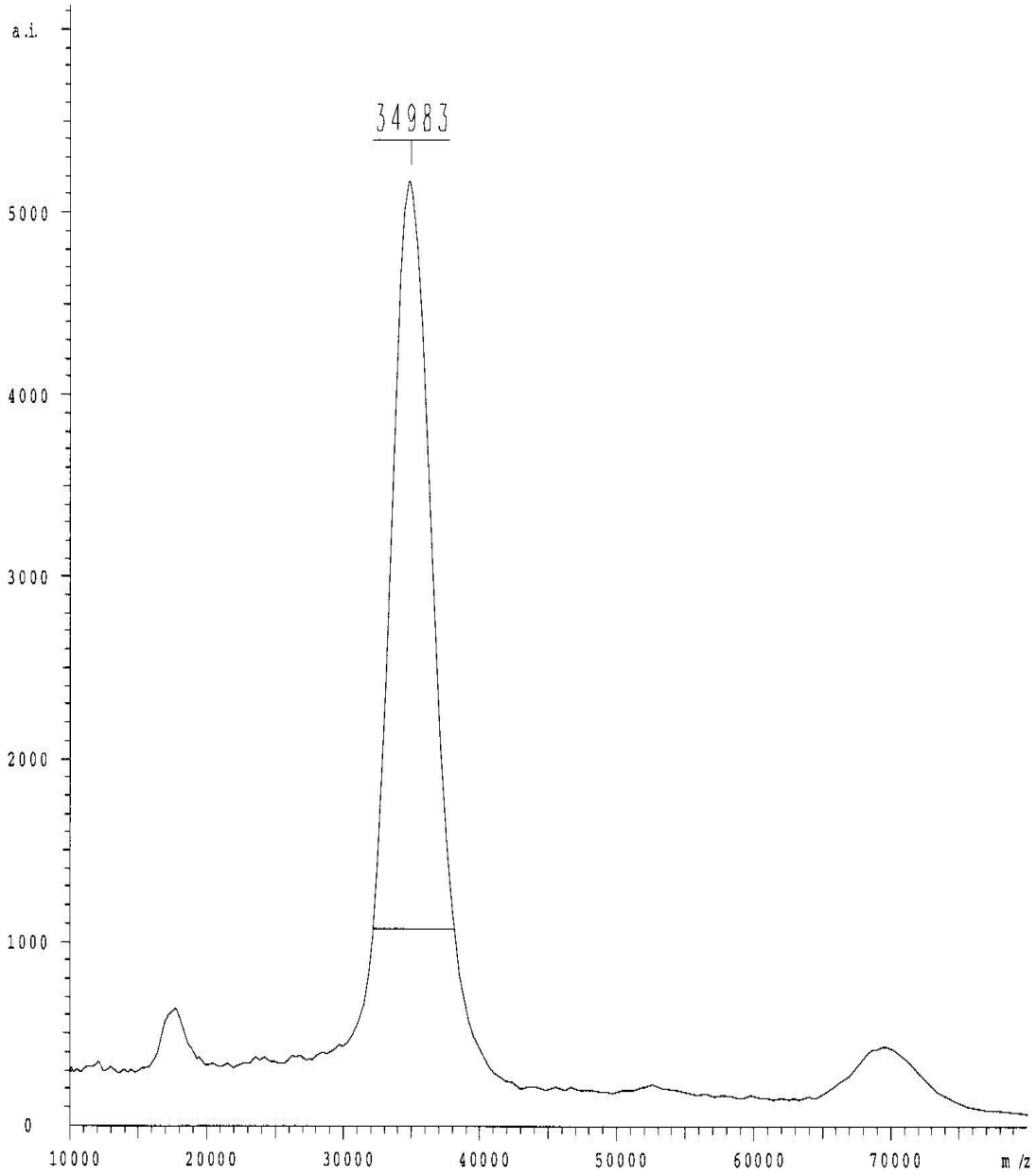


FIGURA 23

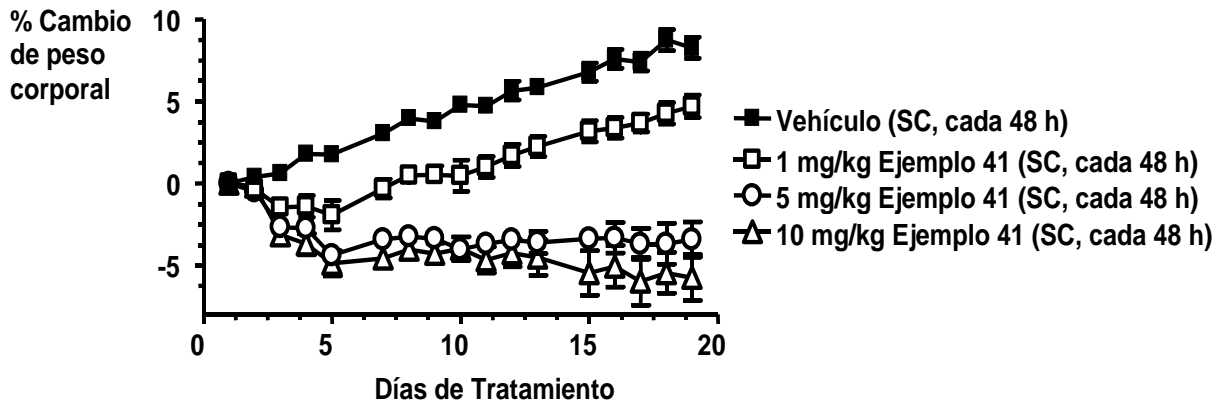
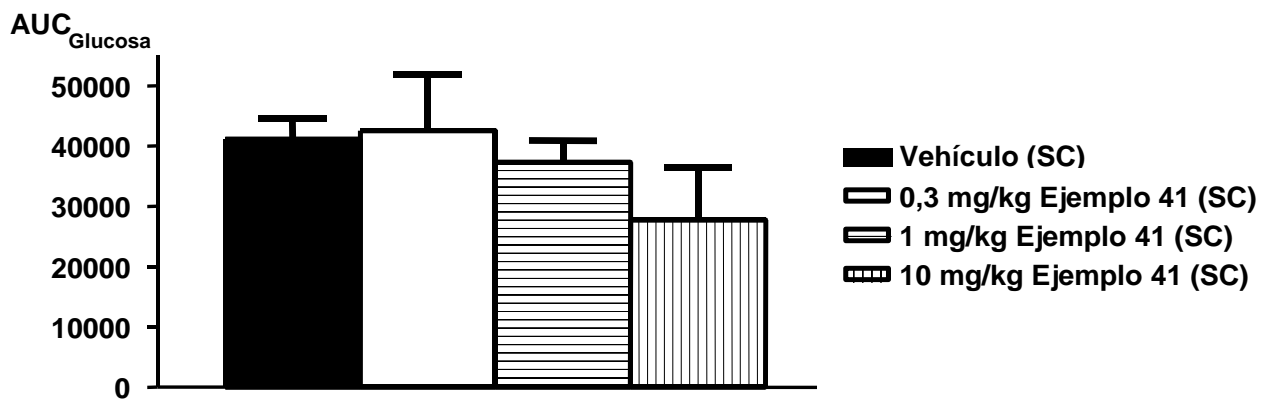


FIGURA 24



EJEMPLO 25

