

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 954**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/08</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/14</b>	(2006.01)
<b>A61P 5/20</b>	(2006.01)
<b>A61P 5/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2010 PCT/US2010/043792**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11014707**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10805078 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2459208**

54 Título: **Agentes terapéuticos para reducir los niveles de hormona paratiroidea**

30 Prioridad:

**12.03.2010 US 313635 P**  
**29.07.2009 US 229695 P**  
**28.10.2009 US 255816 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.04.2017**

73 Titular/es:

**KAI PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**270 Littlefield Avenue**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**KARIM, FELIX;**  
**BARUCH, AMOS;**  
**MACLEAN, DEREK;**  
**DAS, KANAD y**  
**YIN, QUN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 607 954 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

Agentes terapéuticos para reducir los niveles de hormona paratiroidea.

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Publicación Provisional de Estados Unidos n.º 61/229.695, presentada el 29 de julio de 2009, y de la Publicación Provisional de Estados Unidos n.º 61/255.816, presentada el 28 de octubre de 2009, y de la Publicación Provisional de Estados Unidos n.º 61/313.635, presentada el 12 de marzo de 2010.

10

## REFERENCIA A LA LISTA DE SECUENCIAS, TABLA O PROGRAMA INFORMÁTICO

Se envía electrónicamente una lista de secuencias a través de EFS en forma de un fichero de texto, creado el 29 de julio de 2010, y denominado "632008017WO00seqlist.txt" (85.400 bytes).

15

## CAMPO TÉCNICO

La materia actual se refiere a compuestos con actividad para disminuir los niveles de la hormona paratiroidea (PTH), a las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y al uso de dichos compuestos y composiciones en los métodos de tratamiento, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de la hipercalcemia o hiperparatiroidismo o la modulación de los niveles de la PTH *in vivo*.

20

## ANTECEDENTES

25 La homeostasis cálcica es el mecanismo mediante el cual el cuerpo mantiene niveles adecuados de calcio. El proceso se regula en gran medida, e implica una interacción compleja entre la absorción, transporte, almacenamiento de calcio en los huesos, la deposición en otros tejidos, y la excreción. La PTH es un regulador de los niveles de calcio en circulación, y funciona para aumentar la concentración de calcio en la sangre al mejorar la liberación del calcio procedente del hueso a través del proceso de resorción ósea; aumentando la reabsorción del calcio procedente de los túbulos renales; y mejorando la absorción del calcio en el intestino al aumentar la producción de 1.25-(OH)<sub>2</sub> vitamina D, la forma activa de vitamina la D. La PTH también estimula la excreción de fósforo del riñón, y aumenta la liberación desde el hueso.

30

La secreción de la PTH se regula mediante el receptor detector de calcio (CaSR), un receptor acoplado a la proteína G expresado por diversos tipos celulares sobre la superficie de las células paratiroideas, que detecta las pequeñas fluctuaciones en la concentración de los iones de calcio extracelular (Ca<sup>2+</sup>) y responde alterando la secreción de la PTH. La activación del CaSR mediante Ca<sup>2+</sup> inhibe la secreción de la PTH de segundos a minutos a través de la inhibición del transporte vesicular, y este proceso se puede modular mediante la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC) del receptor. El CaSR también se expresa sobre los osteoblastos y en el riñón, donde regula la excreción renal de Ca<sup>2+</sup>.

35

40

Además, la PTH regula la homeostasis de fósforo, la PTH estimula al receptor 1 de la hormona paratiroidea (PTHr1) o las membranas de las células tanto apicales (membrana de células en cepillo) como basolaterales en el tracto GI. La estimulación del PTHR1 conduce a un aumento en la excreción urinaria de fosfato (Pi) como una consecuencia de la reducción por la internalización del co-transportador renal de Na<sup>+</sup>/fosfato (NaPi-IIa) sobre la membrana de las células en cepillo.

45

La PTH también se implica en la regulación de los osteoblastos y osteoclastos en el hueso. La PTH aumenta el Ca<sup>2+</sup> en circulación al aumentar la resorción ósea y la reabsorción renal de calcio. La PTH estimula a que los osteoblastos produzcan el ligando RANK (RANKL), que se une al receptor RANK y activa los osteoclastos, conduciendo a un aumento en la resorción ósea y un aumento en el Ca<sup>2+</sup> sérico. La osteoprotegerina (OPG) es un receptor simulado para el RANKL que bloquea la resorción ósea. La osteoporosis se provoca por un desequilibrio entre los procesos de la resorción ósea mediante los osteoclastos y la formación de hueso por los osteoblastos.

50

55 El cuerpo humano contiene aproximadamente 1 kg de calcio, el 99 % del cual reside en el hueso. En condiciones normales, el ión de calcio en circulación (Ca<sup>2+</sup>) se mantiene estrechamente a un nivel de aproximadamente 9 a 10 mg/dl (es decir, 2,25-2,5 mmol/l; ~600 mg). Aproximadamente 1 g del calcio elemental (Ca<sup>2+</sup>) se ingiere diariamente. De esta cantidad, se absorben aproximadamente 200 mg/día, y se excretan 800 mg/día. Además, se liberan aproximadamente 500 mg/día mediante la resorción ósea o se depositan en el hueso. Aproximadamente 10 g de

$\text{Ca}^{2+}$  se filtran a través del riñón al día, apareciendo aproximadamente 200 mg en la orina, y el resto que se reabsorberá.

- La hipercalcemia es un nivel elevado de calcio en la sangre. La hipercalcemia aguda puede dar como resultado 5 síntomas gastrointestinales (anorexia, náuseas, vómitos); renales (poliuria, polidipsia), neuro-musculares (depresión, confusión, estupor, coma) y cardiacos (bradicardia, auriculo-ventricular de primer grado). La hipercalcemia crónica también se asocia a síntomas gastrointestinales (dispepsia, estreñimiento, pancreatitis); renales (nefrolitiasis, nefrocalcinosis); neuromusculares (debilidad) y cardiacos (bloqueo por hipertensión, sensibilidad por digitales). Pueden dar como resultado frecuencias cardiacas anormales, y los hallazgos EKG de un intervalo QT corto y una 10 onda T extendida sugieren hipercalcemia. La hipercalcemia puede ser asintomática, presentándose los síntomas más comúnmente a niveles altos de calcio (12,0 mg/dl o 3 mmol/l). La hipercalcemia grave (por encima de 15-16 mg/dl o 3,75-4 mmol/l) se considera una emergencia médica: a estos niveles, puede producirse un coma y un fallo cardiaco.
- 15 La hipercalcemia con frecuencia se provoca por el hiperparatiroidismo, que conduce a una resorción ósea en exceso y niveles elevados de calcio sérico. En el hiperparatiroidismo esporádico primario, se sobre-produce la PTH mediante un adenoma paratiroideo individual; de manera menos común, se pueden provocar adenomas múltiples o hiperplasia difusa de la glándula paratiroides. La secreción aumentada de la PTH conduce a un aumento neto en la resorción ósea, con la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato (Pi). La PTH también mejora la reabsorción renal de  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibe 20 la reabsorción de fosfato (Pi), dando como resultado un aumento neto en el calcio sérico y una disminución en el fosfato.

- El hiperparatiroidismo secundario se presenta cuando una disminución en los niveles en circulación del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la secreción de la PTH. Una causa del hiperparatiroidismo secundario es la insuficiencia renal crónica 25 (también denominada como enfermedad renal crónica o CKD), tal como en la enfermedad renal poliquística o pielonefritis crónica o fallo renal crónico, tal como en pacientes con hemodiálisis (también denominada como enfermedad renal en etapa terminal o ESRD). Se puede producir PTH en exceso en respuesta a la hipocalcemia resultante de la baja ingestión de calcio, trastornos GI, insuficiencia renal, deficiencia de vitamina D, e hipercalcemia renal. El hiperparatiroidismo terciario se puede presentar después de un largo periodo de hiperparatiroidismo 30 secundario e hipercalcemia.

- La neoplasia es una causa común de la hipercalcemia no producida por la PTH. La hipercalcemia de neoplasia, es una complicación poco común aunque grave del cáncer, que afecta entre el 10 % y el 20 % de pacientes con cáncer, y se puede presentar tanto con tumores sólidos como con leucemia. La afección tiene una abrupta aparición y tiene 35 un pronóstico muy deficiente, con una supervivencia media de sólo seis semanas. Los factores de crecimiento (GF) regular la producción de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) en células tumorales. Las células tumorales se pueden estimular mediante el GF autocrino para aumentar la producción de la PTHrP, lo que conduce a una resorción ósea mejorada. Las células tumorales metastáticas para el hueso también pueden secretar la PTHrP, que puede resorber hueso y liberar GF adicional que a su vez actúa de una forma paracrina para mejorar 40 adicionalmente la producción de PTHrP. El documento US 2009/023652 desvela péptidos moduladores de calcio policatiónicos para el tratamiento de hiperparatiroidismo y trastornos hipercalcémicos.

Por consiguiente, se desean compuestos con actividad para, por ejemplo, modular los niveles de la PTH y/o los niveles de calcio *in vivo*.

#### 45 **BREVE RESUMEN**

- En un aspecto, se proporciona un compuesto, que comprende un péptido y un grupo de conjugación, donde el péptido comprende una secuencia aminoacídica que tiene la fórmula 50



- donde  $X_1$  es D-cisteína;  $X_2$  es D-arginina, D-alanina, D-valina, D-leucina, D-fenilalanina, D-serina, D-glutamina, D-norleucina o D-norvalina;  $X_3$  es D-arginina;  $X_4$  es D-arginina o un aminoácido no catiónico, donde  $X_4$  no es glicina, 55 porlina o un aminoácido con una cadena lateral ácida;  $X_5$  es D-arginina;  $X_6$  es D-alanina, D-glicina o D-serina;  $X_7$  es D-arginina; y donde el péptido está unido en su extremo N al grupo de conjugación mediante un enlace disulfuro.

En otra realización, la subunidad  $X_1$  se modifica químicamente para comprender un grupo acetilo, un grupo benzoílo,

un grupo butilo, u otro aminoácido, tal como beta-alanina acetilada.

En otra realización más, el resto tiol de la X<sub>1</sub> D-cisteína se une por un enlace covalente a un segundo resto tiol.

5 En otra realización, la secuencia continua de los residuos aminoacídicos se une a un compuesto para facilitar el transporte a través de la membrana celular. En otra realización, la secuencia contigua de los residuos aminoacídicos se une a un compuesto que mejora la administración de la secuencia en o a través de una o más capas de tejido.

En otra realización, la secuencia contigua de los residuos aminoacídicos está contenida dentro de una secuencia de  
10 residuos aminoacídicos de 8-50 residuos aminoacídicos, 8-40 residuos aminoacídicos, 8-30 residuos aminoacídicos u 8-20 residuos aminoacídicos de longitud. En otra realización más, la secuencia contigua de los residuos aminoacídicos está contenida dentro de una secuencia de residuos aminoacídicos de 8-19 residuos aminoacídicos, 8-18 residuos aminoacídicos, 8-17 residuos aminoacídicos, 8-16 residuos aminoacídicos, 8-15 residuos aminoacídicos, 8-14 residuos aminoacídicos, 8-13 residuos aminoacídicos, 8-12 residuos aminoacídicos, 8-11  
15 residuos aminoacídicos, 8-10 residuos aminoacídicos, u 8-9 residuos aminoacídicos de longitud.

En otra realización, la secuencia contigua en cualquiera de los compuestos descritos se une covalentemente a través del residuo de cisteína en la subunidad X<sub>1</sub> a una segunda secuencia contigua. Por ejemplo, la segunda secuencia contigua puede ser idéntica a la secuencia contigua (para formar un dímero), o pueden no ser idénticas,  
20 como podría ser el caso cuando se une a una porción que facilite la transferencia de la secuencia contigua a través de una membrana celular.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto que está comprendido por un péptido que comprende la secuencia carrar (SEQ ID NO:2) y un grupo de conjugación, dicho péptido unido por un enlace disulfuro.

25 En una realización, el péptido está químicamente modificado en el extremo N, el extremo C, o ambos.

En otra realización, el extremo N del péptido está químicamente modificado por acetilación y el extremo C está químicamente modificado por amidación.

30 En otra realización, el compuesto es Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3).

En otro aspecto, se contempla una composición que comprende un compuesto como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece hiperparatiroidismo secundario (SHPT) o un  
35 trastorno hipercalcémico, donde se proporciona un compuesto como se describe en el presente documento al sujeto. En diversas realizaciones, el sujeto puede padecer una enfermedad renal crónica u otra afección.

En una realización, la composición comprende un compuesto como se define en el presente documento para su uso en la disminución de los niveles de hormona paratiroidea en un sujeto. En una realización, el descenso de la  
40 concentración de hormona paratiroidea es un descenso de la concentración de hormona paratiroidea en sangre o plasma en un sujeto tratado con el compuesto con respecto a la concentración de hormona paratiroidea en sangre o plasma en el sujeto antes del tratamiento. En otra realización, el descenso de la concentración de hormona paratiroidea se consigue en la ausencia de una respuesta de histamina.

45 En otro aspecto, se proporciona un régimen de tratamiento, comprendiendo el régimen proporcionar un compuesto de acuerdo con cualquiera de los descritos en el presente documento, en combinación con un segundo agente.

En una realización, la composición comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico que es vitamina D, un análogo de vitamina D o clorhidrato de cinacalcet.

#### 50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas con insuficiencia renal aguda (modelo 1 K1 C), donde a las ratas se les dosificó Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4, rombos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5, cuadrados de color negro), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, triángulos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7, cuadrados de color blanco), o control de solución salina (símbolos x);

la figura 2A es un gráfico de la concentración de IP<sub>1</sub>, en nM, en función de la concentración de compuesto de Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26, cuadrados) y Ac-arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29, triángulos), como una medida de la

capacidad del compuesto para activar el CaSR humano en un ensayo celular *in vitro* cuando el CaSR humano se expresa como una línea celular HEK-293 transfectada estable;

la figura 2B muestra la reducción de la concentración de PTH tras la administración *in vivo* de péptidos identificados como SEQ ID NO:26 (Ac-carrar-NH<sub>2</sub>) (cuadrados) y como SEQ ID NO:29 (Ac-arrar-NH<sub>2</sub>) (rombos), donde los péptidos se administran como un bolo IV a ratas Sprague Dawley normales a dosis de 9 mg/kg para la SEQ ID NO:29 y a 0,5 mg/kg para SEQ ID NO:26. Se usó un bolo intravenoso (IV) de solución salina como control (línea discontinua). Los niveles de PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación y 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación. Los resultados se presentan como media del grupo  $\pm$  desviación estándar (DE), y la PTH se muestra como el porcentaje del valor pre-dosis inicial;

la figura 3 es un gráfico de barras que compara la liberación de histamina tras la administración de un bolo IV de diversos compuestos en ratas Sprague Dawley normales, donde los compuestos Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5), Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41) se dosificaron en una dosis de bolo IV equimolar de 2,1  $\mu$ mol/kg, y la histamina en plasma se midió antes de la dosificación (pre-dosis), 5, 15 y 30 minutos después de la dosificación;

la figura 4 es un gráfico de barras que compara la liberación de histamina tras la administración de un bolo IV de dos compuestos en ratas Sprague Dawley normales, donde los compuestos Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3, barras sombreadas) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, barras de color blanco) se dosificaron a 3 mg/kg, y la histamina en plasma se midió antes de la dosificación (tiempo cero) y 5, 15 y 30 minutos después de la dosificación;

la figura 5 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas normales dosificadas con 0,5 mg/kg por un bolo IV de Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, rombos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:8, cuadrados), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9, triángulos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10, símbolos x), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11, símbolos \*), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12, círculos) o Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13, símbolos +);

las figuras 6A-6B son gráficos del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas sanas dosificadas con 0,5 mg/kg por bolo IV de Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26, rombos de color blanco), Ac-crrarar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25, cuadrados de color blanco), Ac-caarrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22, triángulos), Ac-craarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:17, cuadrados de color negro), Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3, rombos figura 6B), Ac-craarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24, símbolos x en la figura 6A); Ac-c(C)rrarar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28, símbolos x, figura 6B);

la figura 7 muestra el descenso en el nivel de hormona paratiroideas en la sangre en función del tiempo, para el compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) administrado como un bolo IV a ratas Sprague Dawley normales a dosis de 1 mg/kg (rombos), 0,5 mg/kg (cuadrados), 0,3 mg/kg (triángulos), y 0,1 mg/kg (símbolos x). Se usó un bolo intravenoso (IV) de solución salina (círculos) como control. Los niveles de PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación y 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación;

la figura 8 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas con insuficiencia renal aguda (modelo 1K1C), en ratas con el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda, donde las ratas se dosificaron a través de un bolo IV con el compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) a dosis de 3 mg/kg (rombos), 1 mg/kg (triángulos), 0,5 mg/kg (cuadrados) y 0,3 mg/kg (símbolos x), o solución salina (cuadrados); la línea discontinua en la figura 8 indica el nivel de PTH inicial previo a la dosificación;

la figura 9 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas dosificadas por vía intravenosa con una solución salina (símbolos x) o con los compuestos Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, rombos de color blanco), y Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26, cuadrados de color blanco) a 1 mg/kg a través de una infusión IV de 30 minutos, donde los niveles de PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación, 16 horas y 24 horas después de la dosificación;

la figura 10 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas con insuficiencia renal aguda (modelo 1K1C), donde las ratas se dosificaron a través de bolo IV con los compuestos Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3, cuadrados, símbolos \*) y Ac-c(Ac-C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:146, triángulos, rombos) a dosis de 0,3 mg/kg (cuadrados, triángulos) y 0,5 mg/kg (\*, rombos);

la figura 11 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función

del tiempo, en horas, en ratas tratadas a través de administración transdérmica facilitada por microporos de Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, dos animales, cuadrados y triángulos) o con solución salina a través de la administración transdérmica (rombos);

5 la figura 12 es un gráfico del nivel de hormona paratiroidea, como porcentaje del valor pre-dosis inicial, en función del tiempo, en horas, en ratas tratadas a través de administración transdérmica facilitada por microporos de Ac-c(C)arrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3);

la figura 13 es un gráfico de la PTH media (como porcentaje del valor inicial) durante y tras una infusión IV de 6  
10 horas de Ac-c(C)arrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) en ratas Sprague-Dawley normales, donde el compuesto se infundió a velocidades de 1 µg/kg/h (cuadrados), 3 µg/kg/h (círculos), y 10 µg/kg/h (triángulos);

la figura 14A muestra la PTH (como un porcentaje del valor inicial) durante y tras la infusión IV de 6 horas de Ac-c(C)arrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) en el modelo de rata 1K1C de insuficiencia renal aguda, donde las ratas se  
15 infundieron por vía intravenosa a velocidades de dosis de 30 µg/kg/h (rombos) y 100 µg/kg/h (cuadrados);

la figura 14B es un gráfico de barras que muestra el calcio sérico, en mg/dl, para las ratas del modelo 1K1C tratadas como en la figura 14A.

La materia objeto actual se puede comprender más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción  
20 detallada de las realizaciones preferidas y los ejemplos incluidos en el presente documento.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### I. Definiciones

25

Dentro de esta solicitud, a menos que se indique otra cosa, las definiciones de los términos e ilustración de las técnicas de esta solicitud se pueden encontrar en cualquiera de las referencias ya conocidas tales como: Sambrook, J., y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Goeddel, D., ed., Gene Expression Technology, Methods in Enzymology, 185, Academic Press, San Diego, CA (1991); "Guide to Protein Purification" en Deutscher, M.P., ed., Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1989); Innis, y col., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA (1990); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª Ed., Alan Liss, inc. Nueva York, NY (1987); Murray, E.J., ed., Gene Transfer and Expression Protocols, págs. 109-128, The Humana Press Inc., Clifton, NJ y Lewin, B., Genes VI, Oxford University Press, Nueva York (1997).

35

Como se usa en el presente documento, la forma singular "uno", "una", y "el", incluyen referencias en plural a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, "un" péptido modulador incluye uno o más péptidos moduladores.

Como se usa en el presente documento, un compuesto tiene "actividad para disminuir el nivel de la hormona paratiroidea" o la "actividad de reducción de PTH" cuando el compuesto, tras la administración a un sujeto, disminuye la hormona paratiroidea (PTH) en plasma con relación a la concentración de la PTH en plasma antes de la administración del compuesto, en una realización, la disminución en el nivel de la PTH es al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 95 % menor una hora después de la administración del compuesto que el nivel de la PTH antes de la administración del compuesto.

45

Como se usa en el presente documento, "ausencia de una respuesta de histamina" o "falta de una respuesta histamínica" se refiere a una dosis de un compuesto que produce un aumento de menos de 15 veces, 14 veces, 13 veces, 12 veces, 11 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, o 3 veces de la histamina, medida *in vitro* en un ensayo como se describe en el presente documento, donde el cambio de veces se  
50 determina en base a los niveles de histamina antes de la incubación con el compuesto y después de 15 minutos de incubación con el compuesto.

Como se usa en el presente documento, "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales. Los veinte aminoácidos de origen natural (L-isómeros) se designan mediante el código de tres letras con el prefijo "L-" (excepto para glicina que es aquiral) o mediante el código de una letra en mayúsculas: alanina ("L-Ala" o "A"), arginina ("L-Arg" o "R"), asparagina ("L-Asn" o "N"), ácido aspártico ("L-Asp" o "D"), cisteína ("L-Cys" o "C"), glutamina ("L-Gln" o "Q"), ácido glutámico ("L-Glu" o "E"), glicina ("Gly" o "G"), histidina ("L-His" o "H"), isoleucina ("L-Ile" o "I"), leucina ("L-Leu" o "L"), lisina ("L-Lys" o "K"), metionina ("L-Met" o "M"), fenilalanina ("L-Phe" o "F"), prolina ("L-Pro" o "P"), serina ("L-Ser" o "S"), treonina ("L-Thr" o "T"), triptófano ("L-Trp" o "W"), tirosina ("L-Tyr" o "Y") y valina ("L-Val" o

"V"). L-norleucina y L-norvalina se pueden representar como (NLeu) y (NVal), respectivamente. Los diecinueve aminoácidos de origen natural que son quirales tienen un D-isómero correspondiente que se designa por el código de tres letras con el prefijo "D-" o mediante el código de una letra en minúsculas: alanina ("D-Ala" o "a"), arginina ("D-Arg" o "r"), asparagina ("D-Asn" o "a"), ácido aspártico ("D-Asp" o "d"), cisteína ("D-Cys" o "c"), glutamina ("D-Gin" o "q"), ácido glutámico ("D-Glu" o "e"), histidina ("D-His" o "h"), isoleucina ("D-Ile" o "i"), leucina ("D-Leu" o "l"), lisina ("D-Lys" o "k"), metionina ("D-Met" o "m"), fenilalanina ("D-Phe" o "f"), prolina ("D-Pro" o "p"), serina ("D-Ser" o "s"), treonina ("D-Thr" o "t"), triptófano ("D-Trp" o "w"), tirosina ("D-Tyr" o "y") y valina ("D-Val" o "v"), D-norleucina y D-norvalina se pueden representar como (dNLeu) y (dNVal), respectivamente. Aunque con frecuencia se utiliza un "residuo de aminoácido" con referencia a una subunidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína y el

10 "aminoácido" con frecuencia se utiliza con referencia a una molécula libre, el uso de estos términos en la técnica se superpone y varía. Las expresiones "aminoácido" y "residuo de aminoácidos" se utilizan indistintamente y pueden hacer referencia a una molécula libre de una subunidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína, dependiendo del contexto.

15 Para determinar la "homología" porcentual o "identidad" porcentual de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en las secuencias de un polipéptido para una alineación óptima con el otro polipéptido). Los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de aminoácidos después se comparan. Cuando se ocupa una posición en una secuencia por el mismo residuo de aminoácidos que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Como se usa en el presente documento, "homología" de aminoácidos o de

20 ácido nucleico es equivalente a "identidad" de aminoácidos o ácido nucleico. Por consiguiente, el porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el porcentaje de identidad de secuencia = números de posiciones idénticas/números totales de las posiciones x 100). El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos se puede

25 determinar utilizando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008). Para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos se utilizan una penalidad de apertura vacía de 10 y una penalidad de extensión vacía de 0,1. Todos los otros parámetros se ajustan en los ajustes por omisión.

Un "aminoácido catiónico" significa un residuo aminoacídico que tenga una carga neta positiva a pH fisiológico (7,4),

30 como sea el caso, por ejemplo, en los residuos de aminoácidos, donde la cadena lateral, o "grupo R", contiene un grupo funcional amino u otro grupo funcional que pueda aceptar un protón para cargarse positivamente a pH fisiológico, tal como una porción de guanidina o imidazol. Los residuos de aminoácidos catiónicos incluyen: arginina, lisina, histidina, ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ornitina, y homoarginina.

35 Una "subunidad catiónica" significa una subunidad que tiene una carga neta positiva a pH fisiológico (7,4).

Como se usa en el presente documento, las "sustituciones conservadoras de aminoácidos" son sustituciones que no dan como resultado un cambio significativo en la actividad o estructura terciaria de un polipéptido o proteína seleccionado. Estas sustituciones típicamente implican reemplazar un residuo aminoacídico seleccionado con un

40 residuo aminoacídico diferente que tenga similares propiedades físico-químicas. Se conocen por los expertos en la técnica agrupamientos de aminoácidos y residuos aminoacídicos mediante propiedades físico-químicas. Por ejemplo, entre los aminoácidos de origen natural, se han definido en la técnica familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares, e incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no

45 cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

50 Como se usa en el presente documento, "reticulación química" se refiere a la unión covalente de dos o más moléculas.

Un péptido o fragmento de péptido se "deriva de" un péptido o polipéptido precursor si tiene una secuencia de aminoácidos que sea idéntica u homóloga al menos a una secuencia contigua de cinco residuos de aminoácidos,

55 más preferiblemente ocho residuos de aminoácidos, del péptido o polipéptido precursor.

Como se usa en el presente documento, el término "hiperparatiroidismo" se refiere a hiperparatiroidismo primario, secundario y terciario, a menos que se indique otra cosa.

El término "intradérmico" significa que en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento se aplica a la piel una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto calcimimético para administrar el compuesto a las capas de la piel por debajo del estrato córneo, y de esta forma conseguir un efecto terapéutico deseado.

5 Como se usa en el presente documento, un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está libre de parte del material celular cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o cuando se sintetizan los precursores químicos u otros productos químicos. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos en las que el polipéptido se separa de parte de los componentes celulares de las células en las que se produce de forma natural o recombinante. Cuando el polipéptido  
10 o porción biológicamente activa del mismo se produce de forma recombinante, preferiblemente también está sustancialmente libre del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, más preferiblemente menos de aproximadamente el 10 %, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5 % del volumen de la preparación de polipéptidos. La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de polipéptidos en las cuales el polipéptido  
15 se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye las preparaciones de un polipéptido que tengan menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) de los precursores químicos u otros productos químicos, preferiblemente menos de aproximadamente el 20 % de precursores químicos u otros productos químicos, más preferiblemente menos de aproximadamente el 15 % de precursores químicos u otros productos químicos, aún más preferiblemente menos de aproximadamente el 10 % de precursores químicos u otros productos químicos, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente el 5 % de precursores químicos u otros productos químicos. En realizaciones preferidas, los polipéptidos aislados, o las porciones biológicamente activas de los mismos, carecen de polipéptidos contaminantes procedentes del mismo organismo del que se deriva el polipéptido dominio.

25 Como se usa en el presente documento, "macromolécula" se refiere a una molécula, tal como un péptido, polipéptido, proteína o ácido nucleico, que típicamente tiene un peso molecular mayor de aproximadamente 900 Daltons.

30 Un "aminoácido no catiónico" significa un residuo aminoacídico que no tiene carga o tiene una carga neta negativa a pH fisiológico (7,4), como es el caso, por ejemplo, en los residuos de aminoácidos, donde la cadena lateral, o "grupo R", es neutro (polar neutro y no polar neutro) y ácido. Los aminoácidos no catiónicos incluyen aquellos residuos con un grupo R que sea una porción de alquilo o aromática de hidrocarburo (por ejemplo, valina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina); un grupo polar R, neutro (asparagina, cisteína, glutamina, serina, treonina, triptófano,  
35 tirosina); o un grupo no polar R, neutro (glicina, metionina, prolina, valina, isoleucina). Los aminoácidos no catiónicos con un grupo R ácido incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Un "polímero" se refiere a una cadena lineal de dos o más subunidades idénticas o no idénticas unidas mediante enlaces covalentes.

40 Como se usa en el presente documento, "péptido" y "polipéptido" se refieren a cualquier polímero constituido de una cadena de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, independientemente de su tamaño. Aunque, "proteína" con frecuencia se utiliza con referencia a polipéptidos relativamente largos, y "péptido" con frecuencia se utiliza con referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica, se superpone y varía. Por lo tanto, por simplicidad, el término "péptido" se utilizará en el presente documento, aunque en algunos casos en la técnica pueda hacer referencia al mismo polímero como un "polipéptido". A menos que se indique otra cosa, la secuencia para un péptido se proporciona en el orden del término amino con respecto al término carboxilo.

Un "grupo que contiene tiol" o "resto que contiene tiol", como se usan en el presente documento, significa un grupo funcional que comprende un enlace de azufre-hidrógeno (-SH), y que es capaz de reaccionar con otro tiol en condiciones fisiológicas para formar un enlace disulfuro. Un tiol que es capaz de formar un enlace disulfuro con otro tiol se denomina en el presente documento como un "tiol reactivo". En una realización preferida, el grupo que contiene tiol tiene menos de 6 átomos lejos de la estructura del compuesto. En una realización más preferida, el grupo que contiene tiol tiene la estructura (-SH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(O)-O-).

55 Como se usa en el presente documento, "molécula pequeña" se refiere a una molécula distinta a una macromolécula, tal como una molécula orgánica, y típicamente tiene un peso molecular de menos de 1000 daltons.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a un sujeto humano o un sujeto animal.



Una "subunidad" significa una unidad monomérica que se une a más de una unidad monomérica diferente para formar un compuesto polimérico, donde una subunidad es el patrón de repetición más corto de elementos en el compuesto polimérico. Las subunidades ilustrativas son aminoácidos, que cuando se enlazan forman un compuesto polimérico tal como los denominados en la técnica como un péptido, un polipéptido o una proteína.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad requerida para producir un efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, en los métodos para reducir el calcio sérico en sujetos hipercalcémicos, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad requerida para reducir los niveles de calcio sérico en al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % o el 25 %. El calcio se puede medir como calcio total o como calcio ionizado. A modo de otro ejemplo, en los métodos para disminuir la PTH *in vivo*, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad requerida para reducir los niveles de la PTH en al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % o el 25 %.

Como se usa en el presente documento, el término "transdérmico" significa que en los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, se aplica una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente calcimimético a la piel para administrar el compuesto a la circulación sistémica y de esta forma alcanzar un efecto terapéutico deseado.

## 20 II. Compuestos

En un aspecto, se proporciona un compuesto que comprende la secuencia de las subunidades  $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ , donde  $X_1$  es D-cisteína;  $X_2$  es D-arginina, D-alanina, D-valina, D-leucina, D-fenilalanina, D-serina, D-glutamina, D-norleucina o D-norvalina;  $X_3$  es D-arginina;  $X_4$  es D-arginina o un aminoácido no catiónico, donde  $X_4$  no es glicina, prolina o un aminoácido con una cadena lateral ácida;  $X_5$  es D-arginina;  $X_6$  es D-alanina, D-glicina o D-serina;  $X_7$  es D-arginina; donde al menos dos de  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  son independientemente una subunidad catiónica; y donde el péptido está unido en su extremo N al grupo de conjugación mediante un enlace disulfuro. Los compuestos tienen actividad para disminuir los niveles de la hormona paratiroidea (PTH) y/o disminuir los niveles de calcio en la sangre de un sujeto. Una disminución en los niveles de hormonas paratiroidea, como se ilustrará más adelante, significa una disminución de la concentración de la PTH en plasma o sangre en un sujeto con relación a la concentración de la PTH en plasma o sangre antes del tratamiento con el compuesto. En una realización, el compuesto consigue una reducción en los péptidos, aunque un experto en la técnica apreciará que los compuestos no peptídicos que tienen la actividad deseada se pueden diseñar en base a los estudios de la relación estructura-actividad descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la hormona paratiroidea o PTH es un péptido de 84 aminoácidos producido por la glándula paratiroides y sus productos de descomposición. Además de la PTH de longitud completa (que consiste en los residuos 1-84 y algunas veces se denomina como PTH "intacta" o "bioactiva"), en la sangre están presentes diversos fragmentos de la PTH generados mediante proteólisis y otras rutas del metabolismo. La región 1-34 amino-terminal de la molécula de PTH intacta está activa biológicamente. Esta región de la molécula contiene la secuencia de aminoácidos que permite que la PTH se una a los receptores de la hormona paratiroidea en tejidos diana.

La región media y 35-84 carboxi-terminal de la molécula de PTH intacta se cree que será biológicamente inerte, aunque posee reactividad inmunológica. La PTH 7-84 se piensa que ejerce efectos que son opuestos a aquellos de la PTH 1-84. Diversos ensayos se han desarrollado para medir los niveles de la PTH, incluyendo diversos productos de descomposición y se revisan por Souberbielle y col., *Kidney International*, 77: 93-100 (2010). En una realización, un compuesto que tiene actividad para disminuir el nivel de la PTH como se define en el presente documento se deduce utilizando un método de cuantificación de la PTH validada que detecte la forma bioactiva intacta de la PTH (1-84), y se conocen en la técnica los kits disponibles en el mercado (por ejemplo, véase el ejemplo 3 en el presente documento).

En un primer estudio, los compuestos que contienen 4 a 7 sub-unidades catiónicas (por ejemplo, arginina) se generaron y se ensayaron para determinar su capacidad para disminuir la PTH en comparación con los valores de PTH de valor inicial y animales tratados con solución salina. Específicamente, se estableció un modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda para utilizarse en la caracterización de la actividad de reducción de la PTH en un entorno de disfunción renal. El modelo 1K1C se describe en el Ejemplo 1A, y los compuestos sintetizados para ensayo incluían (i) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4), (ii) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5), (iii) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), (iv) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7) y (v) control de solución salina.

- Como se describe en el Ejemplo 1 B, los compuestos identificados como SEQ ID: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7 se administraron cada uno mediante una infusión IV de 30 minutos a animales modelo 1K1C. La figura 1 muestra la reducción en los niveles PTH en plasma como un porcentaje del nivel de pre-dosificación (valor inicial).
- 5 Los cuatro compuestos dosificados a 3 mg/kg produjeron una caída significativa en la PTH en plasma, aunque las diferencias en la potencia y duración de la reducción de la PTH sugieren una relación entre la carga positiva neta y la actividad para disminuir la PTH. Por ejemplo, el compuesto Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6; triángulos) con seis subunidades catiónicas (arginina) tuvo un aumento de la eficacia, así como la duración de la acción en comparación con los compuestos Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4; rombos) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5: cuadrados), que contenían
- 10 cuatro y cinco subunidades catiónicas (arginina), respectivamente. Sorprendentemente, el compuesto Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6; triángulos) con seis subunidades catiónicas (arginina) tuvo un aumento de la duración de acción en comparación con el compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7, cuadrados de color blanco) con siete residuos catiónicos (arginina), lo que sugiere que la actividad o potencia de los compuestos no se correlaciona simplemente con el aumento de la carga catiónica del compuesto. Es decir, el compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7) con siete
- 15 subunidades catiónicas (residuos de arginina) produjo una caída inicial similar en la PTH como los compuestos con menos residuos catiónicos, aunque a lo largo de las 24 horas después de la dosificación fue menos eficaz que Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5). Estos últimos dos compuestos produjeron una reducción media de la PTH de ~40 % y 60 % en el punto de tiempo de 24 horas, respectivamente. Tanto el grado de reducción de la PTH como la duración de la PTH son criterios importantes para obtener un beneficio terapéutico óptimo para
- 20 pacientes que necesitan del tratamiento. Se debe observar que los compuestos en este estudio se administraron a la misma dosis de mg/kg pero, debido a diferencias en el peso molecular, realmente se dosificó un número diferente de moles de cada compuesto. Por lo tanto, Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) fue significativamente más potente que Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5) en una base por moles.
- 25 Se realizaron estudios adicionales para explorar la relación de estructura-actividad de los compuestos. El compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se modificó mediante el reemplazo secuencial de un residuo de arginina con un residuo de alanina en cada una de las posiciones subunitarias X<sub>2</sub>-X<sub>7</sub>. Los compuestos se caracterizaron en un ensayo del receptor para detección de calcio (CaSR) humano *in vitro*, descrito en el Ejemplo 2, donde se utilizaron células HEK 293 que expresan el receptor detección de calcio humano para medir la actividad de los compuestos
- 30 ilustrativos. Sin desear quedar ligado por la teoría, se piensa que el mecanismo mediante el cual los compuestos descritos disminuyen la PTH *in vivo*, es a través de la activación del CaSR, que se expresa en la glándula paratiroides y controla la secreción de la PTH. La activación del CaSR conduce a un aumento en el calcio intracelular y el inositol-3-fosfato (IP3) y la acumulación posterior de inositol-fosfato-1 (IP<sub>1</sub>). Por consiguiente, en este ensayo *in vitro*, se determinó la concentración eficaz máxima media del compuesto para reducir la generación de IP<sub>1</sub>
- 35 en un 50 % (EC<sub>50</sub>). Los mismos compuestos también se ensayaron *in vivo* para determinar su actividad de reducción de la PTH, como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Los números en la columna titulada "% de AUC de PTH (1-4 h) de control de solución salina" de la Tabla 1 definen la actividad como la reducción en el área bajo la curva (AUC) de PTH durante 4 horas como un porcentaje del AUC de PTH derivada de las ratas de control tratadas con solución salina. Por ejemplo, un AUC (compuesto tratado)/AUC (control de solución salina) x
- 40 100 que es igual a 0 podría ser indicativa de un compuesto de reducción de PTH bastante activo que suprime completamente la PTH (a un nivel indetectable) durante 4 horas después de una administración IV individual de ratas normales anestesiadas con isoflurano (IF). Por el contrario, un valor de AUC (compuesto tratado)/AUC (control de solución salina) x 100 que es igual o mayor que 100 podría ser indicativo de un compuesto inactivo.

45

Tabla 1

<i>Actividad in vitro e in vivo de compuestos ejemplares</i>				
SEQ ID NO.	Estructura*	<b>Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales**</b>		EC <sub>50</sub> <i>in vitro</i> (uM)
		% de reducción de PTH del valor inicial 1 hora después de la admin. IV de 0,5 mg/kg de compuesto	0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina	
SEQ ID NO:6	Ac-crrrrr-NH <sub>2</sub>	4	0	0,5
SEQ ID NO:8	Ac-carrrrr-NH <sub>2</sub>	0	0	1,1
SEQ ID NO:9	Ac-crarrrr-NH <sub>2</sub>	0	7	1,0
SEQ ID NO:10	Ac-crrarr-NH <sub>2</sub>	0	0	1,1

SEQ ID NO:11	Ac-crrrarr-NH <sub>2</sub>	9	45	5,9
SEQ ID NO:12	Ac-crrrrar-NH <sub>2</sub>	3	3	0,45
SEQ ID NO:13	Ac-crrrrra-NH <sub>2</sub>	4	28	1,1
	Solución salina	128	100	ND

\*La fuente en negrita indica sustituciones de D-alanina de aminoácidos catiónicos (D-arginina) en la SEQ ID NO:6.  
 \*\*Reducción de la PTH después de la administración IV de 0,5 mg/kg en ratas normales anestesiadas con isoflurano - la PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas después de la administración y se calculó el AUC acumulativa. Los datos de la PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula  $AUC_{comp. tratado} / AUC_{control de solución salina} * 100$ .

En la Tabla 1, los compuestos Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:8) y Ac-crrrarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10) fueron muy potentes, como resulta evidente por la disminución en la PTH porcentual a menos del límite de detección o esencialmente cero según se mide *in vivo* después de una administración IV individual en ratas normales. La sustitución del residuo catiónico (arginina) en las posiciones 2, 3, 4 o 7 de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) dio como resultado en una pérdida de aproximadamente dos veces la potencia *in vitro*. La sustitución en la posición 5 para producir el compuesto Ac-crrrarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11) produjo una reducción de 5-10 veces en la potencia *in vitro*, aunque la reducción AUC de la PTH porcentual *in vivo* del 45 % podría ser suficientemente activa para una terapia clínica. Sorprendentemente, la sustitución del residuo de arginina catiónica en la posición 6 con el residuo no cargado (alanina) realmente mejoró la potencia. Los datos ilustran que los residuos catiónicos y no cargados en diferentes posiciones no son todos iguales y hay cambios en la actividad como resultado del cambio en la estructura del compuesto.

Para evaluar adicionalmente el efecto de cambio en la actividad como una función de cambio en la estructura del compuesto, se generó otra serie de análogos de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) que contenían dobles sustituciones de aminoácidos, donde dos residuos catiónicos (arginina) se reemplazaron por residuos no cargados (alanina), y se ensayaron para determinar la potencia. En la Tabla 2 se muestran los datos. Es importante observar que esta serie de compuestos tiene la misma carga neta catiónica que la SEQ ID NO:4 (cuatro residuos catiónicos), sorprendentemente todavía algunos muy activos (SEQ ID NO:26) con muy bajo % de AUC de la PTH del control con solución salina mientras que otros son inactivos (por ejemplo, la SEQ ID NO:14). Inesperadamente, esto sugiere que la posición de cambios, así como la carga catiónica total pueden influir en la potencia de los compuestos para la reducción de la PTH. Los datos mostrados en la Tabla 2 son consistentes con los datos mostrados en la Tabla 1, lo que sugiere que los residuos catiónicos de la SEQ ID NO:6 son esenciales en las posiciones 5 y 7, aunque no se requieren en la posición 6, para la actividad de reducción de la PTH.

25

Tabla 2

Actividad <i>in vivo</i> de los compuestos ejemplares			
SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto*	Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales**	
		% de reducción de PTH del valor inicial 1 hora después de la administración IV de 0,5 mg/kg del compuesto	0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina*
Solución Salina	Solución salina	128	100
SEQ ID NO:14	Ac-crrarra-NH <sub>2</sub>	86	130
SEQ ID NO:15	Ac-cararr-NH <sub>2</sub>	75	116
SEQ ID NO:16	Ac-carrarr-NH <sub>2</sub>	118	105
SEQ ID NQ:17	Ac-crraarr-NH <sub>2</sub>	39	102
SEQ ID NO:18	Ac-crararr-NH <sub>2</sub>	72	87
SEQ ID NO:19	Ac-crrrrra-NH <sub>2</sub>	29	72

SEQ ID NO:20	Ac-crarrra-NH <sub>2</sub>	45	69
SEQ ID NO:21	Ac-crrraar-NH <sub>2</sub>	36	50
SEQ ID NO:22	Ac-caarrrr-NH <sub>2</sub>	24	48
SEQ ID NO:23	Ac-crarrar-NH <sub>2</sub>	0	43
SEQ ID NO:24	Ac-craarr-NH <sub>2</sub>	8	9
SEQ ID NO:25	Ac-crrrar-NH <sub>2</sub>	4	6
SEQ ID NO:26	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	0	1
SEQ ID NO:27	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	2	8
SEQ ID NO:28	Ac-c(C)rrrar-NH <sub>2</sub>	0	16

\*La fuente en negrita indica sustituciones de D-alanina de aminoácidos catiónicos (D-arginina) en Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6)

\*\*Reducción de la PTH después de la administración IV de 0,5 mg/kg en ratas normales anestesiadas con isoflurano - la PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas después de la administración y se calculó el AUC acumulativa. Los datos de la PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula  $AUC_{comp. tratado}/AUC_{control de solución salina} * 100$ .

Los datos en la Tabla 2 ilustran los cambios estructurales que influyen en la actividad. En una realización, el compuesto es Ac-caarrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22) y en otra realización, el compuesto es Ac-craarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24).

5

Se realizaron estudios adicionales de la relación estructura-actividad utilizando el ensayo celular *in vitro* en células HEK 293 que expresan el receptor de detección de calcio humano, como se describe en el Ejemplo 4. Se determinó la capacidad de los péptidos Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) y Ac-arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29) para activar el CaSR humano mediante la medición de la acumulación de monofosfato de inositol (IP<sub>1</sub>), que es un reflejo de la producción de IP<sub>3</sub>. La producción de IP<sub>3</sub> es un mensajero secundario de señalización celular importante y su producción es una consecuencia aguas abajo directa de la activación de CaSR. La acumulación de IP<sub>1</sub> después de la producción de IP<sub>3</sub> se puede obtener mediante el tratamiento de las células utilizadas en el ensayo con cloruro de litio (LiCl<sub>2</sub>) que inhibe la enzima que convierte IP<sub>1</sub> en inositol. En los estudios descritos en el Ejemplo 4, se midió la acumulación de IP<sub>1</sub> en presencia de los compuestos ilustrativos Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) y Ac-arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29).

15 Los resultados se muestran en la figura 2A.

La concentración del IP<sub>1</sub> se indica como nM a lo largo del eje Y y las concentraciones del compuesto de la SEQ ID NO:26 o la SEQ ID NO:29 se indican como M a lo largo del eje X. La ausencia del residuo de D-cisteína N-terminal de la SEQ ID NO:29 redujo drásticamente la capacidad del compuesto para activar el CaSR en comparación con la SEQ ID NO:26. Es decir, la eliminación del residuo de cisteína N-terminal redujo significativamente la potencia del compuesto, ya que los péptidos Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) y Ac-arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29) difieren únicamente en la presencia o ausencia de la D-cisteína N-terminal.

La contribución del grupo que contiene tiol en la subunidad X<sub>1</sub> del compuesto (por ejemplo, en ciertas realizaciones donde el compuesto es un péptido en el residuo N-terminal), también se investigó en un estudio *in vivo*. La actividad para disminuir la PTH de los péptidos identificados como la SEQ ID NO:26 (Ac-carrar-NH<sub>2</sub>) y como la SEQ ID NO:29 (Ac-arrar-NH<sub>2</sub>) se evaluó *in vivo* de acuerdo con los procedimientos en el Ejemplo 4. Los niveles de la PTH en plasma se valoraron antes de la dosificación y 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación. Los resultados se muestran en la figura 2B. Como se observa, una dosis de 0,5 mg/kg del péptido Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) (cuadrados) disminuyó la concentración en sangre de la PTH a un nivel no detectable hasta 4 horas después de la dosificación. Por el contrario, el péptido que carece de un residuo N-terminal con un grupo que contiene tiol, Ac-arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29), rombos, no redujo la concentración de la PTH, ni siquiera a una dosis sustancialmente mayor (es decir, 9 mg/kg).

35 La relación estructura-actividad del grupo que contiene tiol en la subunidad X<sub>1</sub> del compuesto se analizó

adicionalmente preparando compuestos con subunidades X1 diferentes. Los compuestos, mostrados en la Tabla 3, se ensayaron *in vivo* en ratas normales para determinar la actividad para reducir la PTH.

Tabla 3

Actividad <i>in vivo</i> de compuestos ejemplares		
SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto	Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales* 0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina**
Solución Salina	Solución salina	100
SEQ ID NO:6	Ac-crrrrrr-NH <sub>2</sub>	3
SEQ ID NO:30	Ac- <b>bAla</b> -crrrrrr-NH <sub>2</sub>	0
SEQ ID NO:31	<b>Mpa</b> -rrrrrr-NH <sub>2</sub>	2
SEQ ID NO:32	Ac- <b>dHcy</b> -rrrrrr-NH <sub>2</sub>	21
SEQ ID NO:33	Ac- <b>dPen</b> -rrrrrr-NH <sub>2</sub>	9

\*La fuente en negrita indica la sustitución respectiva del residuo que contiene tiol (D-cisteína) en Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6).

\*\*Reducción de PTH tras 0,5 mg/kg de administración IV en ratas normales anestesiadas con isoflurano - PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración y se calculó el AUC acumulada. Los datos de PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:  $AUC_{comp. tratado} / AUC_{control de solución salina} * 100$ .

5

Los datos en la Tabla 3 ilustran que se puede variar la subunidad X<sub>1</sub> que contiene tiol. Se ensayaron los compuestos con lo siguiente en el residuo N-terminal -D-cisteína (cys), D-penicilamina (dPen), d-homocisteína (dHcy) y ácido mercaptopropiónico (Mpa). Además, un aminoácido natural o no natural, tal como beta alanina, se puede conjugar para el residuo que contiene tiol N-terminal. Los datos ilustran que los compuestos catiónicos tales como Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) que contienen diferentes grupos que contienen tiol en la subunidad X<sub>1</sub> reducen eficazmente la PTH *in vivo*. La sustitución del residuo de cisteína N-terminal con metionina, que no contiene un grupo tiol, dio como resultado un compuesto con muy baja actividad de reducción de PTH *in vivo* (datos no mostrados).

En base a los estudios anteriores, los compuestos de la secuencia contigua de las subunidades X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub>, donde X<sub>1</sub> es una subunidad que comprende un grupo que contiene tiol, tienen actividad para disminuir los niveles de la hormona paratiroidea. En una realización, el grupo que contiene tiol en la subunidad X se selecciona del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos que contienen tiol y las porciones que contienen tiol orgánico. En otra realización, el grupo que contiene tiol es capaz de reaccionar con otro grupo tiol a pH y temperatura fisiológicos. En ciertas realizaciones donde el residuo que contiene tiol es un residuo de aminoácido, la subunidad X puede ser una cualquiera de cisteína, glutatión, ácido mercapto-propiónico, cisteína N-acetilada y cisteína PEGilada. En realizaciones donde el grupo que contiene tiol es una subunidad de un residuo que no es de aminoácidos, tal como una pequeña molécula orgánica con un grupo que contiene tiol, la subunidad X<sub>1</sub> puede ser un resto tiol-alquilo, o tioacilo, tales como los residuos de 3-mercaptopropilo o 3-mercaptopropionilo. En una realización, el tiol no es homocisteína.

25

Por consiguiente, y en otra realización, los compuestos descritos en el presente documento tienen "actividad clínica para disminuir el nivel de la hormona paratiroidea", lo que significa que el compuesto, tras su administración a un sujeto, disminuye la hormona paratiroidea en plasma según se mide mediante el área bajo la curva de la PTH acumulada (AUC de la PTH) durante 4 horas después de la administración en comparación con el AUC de la PTH de un sujeto de control tratado con el vehículo correspondiente. Las concentraciones de la PTH en plasma se miden utilizando, por ejemplo, un kit ELISA disponible en el mercado que detecta la PTH 1-84 intacta bioactiva (véase el Ejemplo 3 para un kit específico). El compuesto con actividad clínica para disminuir el nivel de la hormona paratiroidea reduce el AUC de la PTH en al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % en comparación con el AUC de PTH de un sujeto de control tratado con el vehículo correspondiente.

35

Los estudios anteriores, y otros descritos más adelante, ilustran realizaciones adicionales de los compuestos descritos en el presente documento, donde la subunidad X<sub>1</sub> en algunas realizaciones se puede modificar químicamente, tal como mediante modificación química para incluir un grupo acetilo, un grupo benzilo, un grupo bencilo, un grupo butilo, un aminoácido natural o no natural tal como beta-alanina acetilada, o se une mediante un enlace covalente a otro resto tiol. Los productos terapéuticos peptídicos pueden ser vulnerables al ataque por peptidasas. Las exopeptidasas típicamente son enzimas no específicas que escinden los residuos de aminoácidos de los términos amino o carboxi de un péptido o proteína. Las endopeptidasas, que se escinden dentro de una secuencia de aminoácidos, también pueden ser no específicas; sin embargo las endopeptidasas con frecuencia reconocen las secuencias amino particulares (sitios de reconocimiento) y escinden el péptido en o cerca de esos

40

sitios. Por consiguiente, se contemplan las modificaciones al compuesto para protegerlo de la degradación proteolítica.

Un método para proteger un péptido de la degradación proteolítica implica modificar químicamente, o "proteger", los extremos amino y/o carboxi de los péptidos. Como se usa en el presente documento, los términos "modificado químicamente" o "protegidos" se utilizan de forma intercambiable para hacer referencia a la introducción de un grupo de bloqueo a un extremo o ambos extremos del compuesto a través de una modificación covalente. Los grupos de bloqueo adecuados sirven para proteger los extremos de los péptidos sin disminuir la actividad biológica de los péptidos. Cualquier residuo situado en los extremos amino o carboxi, o ambos, de los compuestos descritos, incluyendo las subunidades que contienen tiol, se puede modificar químicamente.

En una realización preferida, el extremo amino del compuesto se modifica químicamente mediante acetilación, para proporcionar un péptido de N-acetilo (que se puede representar como "Ac-" en una estructura o fórmula en el presente documento). En una realización preferida, el extremo carboxi de los péptidos descritos, se modifica químicamente mediante amidación para proporcionar una carboxamida primaria en el extremo C (que se puede representar como "-NH<sub>2</sub>" en una secuencia peptídica, estructura, o fórmula en el presente documento). En una realización preferida, tanto el extremo amino como el extremo carboxi se modifican químicamente mediante acetilación y amidación, respectivamente. Sin embargo, son posibles otros grupos de protección. Por ejemplo, el extremo amino se puede proteger mediante acilación con grupos tales como un grupo acetilo, un grupo benzoílo, o con aminoácidos naturales o no naturales, tales como beta-alanina protegida con un grupo acetilo, o mediante alquilación con grupos tales como un grupo bencilo o un grupo butilo, o mediante sulfonilación para formar sulfonamidas. De forma similar, el extremo carboxi se puede esterificar, o convertir en una amida secundaria, y una sulfonamida de acilo, o similar. En algunas realizaciones, el extremo amino o el extremo carboxi pueden comprender un sitio para la unión de un resto polietilenglicol (PEG), es decir, los extremos amino o carboxi se pueden modificar químicamente mediante reacción con un PEG funcionalizado adecuadamente.

La protección de los péptidos de las endopeptidasas típicamente implica la identificación y eliminación de un sitio de reconocimiento de endopeptidasa de un péptido. Los sitios de reconocimiento de proteasa se conocen bien por los expertos en la técnica. Por lo tanto, es posible identificar un sitio de reconocimiento potencial de endoproteasa y después eliminar ese sitio alterando la secuencia de aminoácidos dentro del sitio de reconocimiento. Los residuos en la secuencia de reconocimiento se pueden mover o eliminar para destruir el sitio de reconocimiento. Preferiblemente, se realiza una sustitución conservadora con uno o más de los aminoácidos que comprenden un sitio de reconocimiento de proteasa identificado.

#### 35 A. Estudios adicionales de la relación estructura-actividad

Se realizaron estudios adicionales de la actividad estructural, para evaluar adicionalmente el efecto de las propiedades de cada subunidad en el compuesto o su actividad terapéutica. Estos estudios se describirán ahora haciendo referencia al Ejemplo 5.

Se preparó una serie de compuestos que tenían un residuo de L-aminoácido sustituido por un residuo de D-aminoácido en base a la estructura de reducción de PTH Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). Los compuestos se administraron a sujetos y se valoraron los niveles de PTH en plasma antes de la dosificación y 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación, como se describe en el Ejemplo 5, y se calculó el AUC como la suma de los valores de concentración de la PTH en los puntos de tiempo de 1, 2, 3 y 4 horas, normalizados por las AUC para el control con solución salina en los mismos puntos del tiempo, multiplicados por 100. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Efecto de la sustitución de L-aminoácidos en la potencia		
Nombre del Compuesto	Estructura	Actividad in vivo en ratas normales 0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH* de control de solución salina
SEQ ID NO:3	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	8
SEQ ID NO:34	Ac-C(C)arrar-NH <sub>2</sub>	17
SEQ ID NO:35	Ac-c(C)Arrrar-NH <sub>2</sub>	68
SEQ ID NO:36	Ac-c(C)aRrar-NH <sub>2</sub>	87
SEQ ID NO:37	Ac-c(C)arRrar-NH <sub>2</sub>	182
SEQ ID NO:38	Ac-c(C)arrRar-NH <sub>2</sub>	130
SEQ ID NO:39	Ac-c(C)arrAr-NH <sub>2</sub>	129

SEQ ID NO:40	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	142
	Solución Salina	100
*Reducción de PTH tras 0,5 mg/kg de administración IV en ratas normales anestesiadas con isoflurano - PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración y se calculó el AUC acumulada. Los datos de PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $AUC_{comp. tratado}/AUC_{control de solución salina} * 100$		

Los compuestos ilustrativos mostrados en la Tabla 4 se modificaron químicamente, tanto en el extremo N como en el extremo C, según se indica por las designaciones Ac y NH<sub>2</sub>. La secuencia de siete subunidades carrar (SEQ ID NO:3), donde todas las estructuras eran residuos de D-aminoácidos, se modificó reemplazando una subunidad en un tiempo con un L-aminoácido. La subunidad X<sub>1</sub> era un residuo D-Cys (o un residuo L-Cys en la SEQ ID NO:34) conjugado a través de un enlace disulfuro con un residuo L-Cys, según se indica mediante la designación entre paréntesis (C). Los datos *in vivo* de la disminución de la PTH en la Tabla 4 muestran que la quiralidad de Arg y Ala afectan la actividad de los compuestos. En una realización, se contempla un compuesto de la secuencia X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub>, donde al menos las subunidades identificadas como X<sub>4</sub> y X<sub>7</sub> son subunidades de residuos de D-aminoácidos. En otra realización, las subunidades identificadas como X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> son subunidades de residuos de D-aminoácidos. En una realización preferida, las subunidades identificadas como X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> son subunidades de residuos de D-aminoácidos. En realizaciones mucho más preferidas, las subunidades identificadas como X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> son subunidades de residuos de D-aminoácidos, y todas las subunidades X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> y X<sub>7</sub> son subunidades de residuos de D-aminoácidos.

En otros estudios, también se descubrió que la sustitución de un péptido que tiene todos los L-aminoácidos con todos los D-aminoácidos no redujo la actividad *in vitro* de los péptidos probados; de hecho, los péptidos compuestos totalmente por los D-aminoácidos parecieron mejorar la potencia para la activación del CaSR. También se mostró que algunos de los residuos catiónicos (arginina), en las posiciones específicas con relación al residuo de cisteína, se podían sustituir con residuos no cargados (alanina) con mínimo efecto sobre la actividad hacia el CaSR.

Para caracterizar adicionalmente la relación entre la estructura y la actividad contra el CaSR, se ensayaron una diversidad de péptidos catiónicos con diferentes números (4 a 8) de los residuos de arginina (cada uno de los cuales contenía una cisteína N-terminal) utilizando el ensayo de células *in vitro* HEK-293. Se descubrió una correlación directa entre el número de subunidades catiónicas y la potencia del compuesto, donde la potencia resulta evidente por la capacidad para activar el CaSR. La reducción del número de subunidades catiónicas (por ejemplo, arginina) de 5 a 4 dio como resultado en el mayor desplazamiento en la potencia (>10 veces) lo que sugiere que puede haber un punto de inflexión de actividad entre los compuestos que tengan estas cargas netas, de que una subunidad catiónica en la subunidad X<sub>5</sub> se prefiera para la actividad. Por consiguiente, se contemplan los compuestos de la estructura X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub>, donde X<sub>5</sub> es una unidad catiónica. En ciertas realizaciones, X<sub>1</sub> es una subunidad que comprende un grupo tiol que es capaz de reaccionar con otro grupo tiol en condiciones fisiológicas (un "tiol reactivo", lo que significa que un tiol reacciona con otro tiol (por ejemplo, cisteína con cisteína) en condiciones fisiológicas de pH 7,4 y temperatura corporal).

De forma inesperada, Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) con seis residuos catiónicos, cuando se evaluó *in vivo*, mostró una mayor y más prolongada actividad que Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41), que tiene ocho residuos catiónicos. Esto contrasta con la observación de que la SEQ ID NO:41 era más potente en la activación del CaSR en este ensayo celular *in vitro*. Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que el rendimiento superior de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) *in vivo* puede ser el resultado de las mejores propiedades farmacocinéticas de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), debido a que se espera que Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6441) se absorba en las células en virtud de su característica de penetración celular, y se elimine así de la proximidad a la porción activa de la CaSR.

Para explorar adicionalmente la relación de estructura-actividad de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), se reemplazan algunos de los residuos catiónicos (arginina) con residuos no cargados (alanina). Se descubrió que el reemplazo de los residuos catiónicos (arginina) en las posiciones subunitarias X<sub>2</sub> y X<sub>4</sub> dio como resultado un compuesto (SEQ ID NO:15) que tuvo una potencia reducida significativamente *in vitro* para activar el CaSR. Por el contrario, el reemplazo de los residuos catiónicos (arginina) en las posiciones subunitarias X<sub>2</sub> y X<sub>6</sub> dio como resultado un compuesto (SEQ ID NO:26) que conservó mucha de la potencia observada con Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6). Estos resultados sugieren que la posición de los residuos cargados en el compuesto contribuye a la potencia y, en algunas realizaciones, puede superar la contribución de la carga positiva total del péptido. También parece que los residuos catiónicos (arginina) en ciertas posiciones, tales como la posición subunitaria X<sub>5</sub>, contribuyen desproporcionalmente a la potencia.

Se descubrió que la presencia de una cisteína N-terminal mejora notablemente la potencia de los péptidos para

activar el CaSR. El CaSR es un receptor acoplado a la proteína de la 7-transmembrana G con un mayor dominio extracelular que funciona como un receptor homodimérico. Existen 18 residuos de cisteína en el dominio extracelular, algunos de los cuales se han mostrado mediante polimorfismo o análisis mutacional que son importantes para la actividad del receptor. Han de apreciarse particularmente las cisteínas 129 y 131 de la región de Bucl

5 Bucle Asa 2 del dominio extracelular. Se piensa que las cisteínas 129 y 131 forman un enlace disulfuro intermolecular entre los dos monómeros del complejo de receptores, que está en una configuración cerrada o inhibida. La mutación de la cisteína 129 activa el CaSR, como lo hace un número de otras mutaciones, incluyendo una supresión total de la región de Bucle 2. La potencia mejorada proporcionada por el residuo de cisteína N-terminal en los compuestos descritos puede ser resultado de una interacción específica con uno o más residuos de

10 cisteína en el dominio extracelular del CaSR.

Para valorar adicionalmente el efecto de la quiralidad de las sustituciones de aminoácidos en la actividad de CaSR *in vitro*, se generó una serie de análogos de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) que contenían sustituciones de L-aminoácido o de aminoácido aquiral (glicina) en diversas posiciones y se ensayaron para determinar la potencia

15 contra el CaSR. Los análogos ensayados incluían Ac-cGrrrGr-NH<sub>2</sub>, (SEQ ID NO:42), (ii) Ac-cArrrAr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43), y (iii) Ac-CaRrRaR-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44). Todos los análogos anteriores tuvieron significativamente menor potencia que Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), que varía de una diferencia de 10 veces para la SEQ ID NO:44 (la más potente de los tres análogos) y una diferencia de más de 2000 veces para la SEQ ID NO:43 (la menos potente de los tres análogos). Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26), en el que los residuos de D-aminoácido catiónico (residuos de D-arginina) en las posiciones 2 y 6 de la SEQ ID NO:6 se reemplazaron mediante los residuos de D-aminoácido no

20 cargados (residuos de D-arginina), el cambio en la actividad fue mucho menor (diferencia de ~3 veces). Por lo tanto, sorprendentemente, se descubrió que la interrupción de todos residuos de D-aminoácidos de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) con dos o más residuos de L-aminoácidos dio como resultado en una reducción significativa de la potencia. También fue sorprendente que la potencia disminuyó más de 80 veces cuando la interrupción del residuo fue un

25 residuo de aminoácidos aquiral no cargado (residuo de glicina) en comparación a cuando fue un residuo de L-aminoácidos no cargados (residuo de L-alanina).

También fue sorprendente que el reemplazo de los dos residuos de D-aminoácidos no cargados (residuos de D-alanina) de Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) con sus homólogos L-(SEQ ID NO:43), dio como resultado una

30 disminución de más de 600 veces en la potencia, mientras que reemplazarlos con un residuo de aminoácidos aquirales no cargados (residuo de glicina) (SEQ ID NO:42) dio como resultado en una reducción de menos de 8 veces en la potencia, y que el reemplazo de tres residuos de D-aminoácidos catiónicos (residuos de D-arginina) de Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) con sus homólogos L- (SEQ ID NO:44), dio como resultado en una diferencia menor a 4 veces en la potencia.

35 La actividad de una diversidad de péptidos y conjugados se ensayó contra el CaSR humano. Estos estudios se realizaron midiendo la producción de IP<sub>1</sub> en células HEK293 que expresan el CaSR humano. Los valores EC<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 5. Cada péptido se ensayó en ocho concentraciones diferentes, por duplicado, para establecer una curva de dosis-respuesta. El ajuste de la curva se realizó utilizando GraphPad Prism. En la Tabla 5, y a lo largo

40 de toda la memoria descriptiva, los residuos proporcionados en mayúsculas son L-aminoácidos, mientras que las letras minúsculas indican D-aminoácidos. "Ac" indica un grupo protector de acetilo, "NH<sub>2</sub>" indica un grupo protector de amida, "Ac-bAla" es una beta-alanina acetilada, "GSH" indica glutatión reducido, "GS" indica glutatión oxidado, "PEG" se refiere a polietilenglicol, "PEG2" y "PEG5" se refieren a restos de polietilenglicol de 2 kDa y 5 kDa, respectivamente, y "Mpa" se refiere a ácido mercaptopropiónico. Un grupo encerrado entre paréntesis indica que el

45 grupo o resto está unido a la cadena lateral de la subunidad anterior o residuo aminoacídico.

Tabla 5

Valores de EC <sub>50</sub> para péptidos catiónicos en ensayo de CaSR <i>in vitro</i>		
Nombre del Compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (µM)
(SEQ ID NO:45) (SEQ ID NO:47)	<p style="text-align: center;">CHDAPIGYD</p> <p style="text-align: center;"> </p> <p style="text-align: center;">Ac-CYGRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub></p>	21



(SEQ ID NO:46) (SEQ ID NO:47)	CPDYHDAGI   Ac-CYGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub>	21
(SEQ ID NO:47)	Ac-CYGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub>	4,5
(SEQ ID NO:48)	Ac-YGRKKRRQRRR-NH <sub>2</sub>	16
(SEQ ID NO:41)	Ac-crrrrrrr-NH <sub>2</sub>	0,3
(SEQ ID NO:6)	Ac-crrrrr-NH <sub>2</sub>	0,5
(SEQ ID NO:15)	Ac-cararr-NH <sub>2</sub>	13
(SEQ ID NO:26)	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	1,6
(SEQ ID NO:4)	Ac-crrrr-NH <sub>2</sub>	16
(SEQ ID NO:5)	Ac-crrrrr-NH <sub>2</sub>	2,5
(SEQ ID NO:7)	Ac-crrrrrr-NH <sub>2</sub>	0,6
(SEQ ID NO:49)	Ac-caraarr-NH <sub>2</sub>	1000
(SEQ ID NO:8)	Ac-carrrrr-NH <sub>2</sub>	1,1
(SEQ ID NO:9)	Ac-crarrrr-NH <sub>2</sub>	1
(SEQ ID NO:10)	Ac-crrarr-NH <sub>2</sub>	1,1
(SEQ ID NO:50)	Ac-cygrkkrrqrrr-NH <sub>2</sub>	2
(SEQ ID NO:51)	H <sub>2</sub> N-crrrrrr-NH <sub>2</sub>   H <sub>2</sub> N-crrrrrr-NH <sub>2</sub>	0,44
(SEQ ID NO:3)	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	10
(SEQ ID NO:52)	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>   Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	0,7
(SEQ ID NO:30)	Ac-bAla-crrrrrr-NH <sub>2</sub>	1
(SEQ ID NO:53)	Ac-c(GS)rrrrrr-NH <sub>2</sub>	7,8
(SEQ ID NO:54)	GS-crrrrr	-
(SEQ ID NO:55)	Ac-c(Ac-C)arrar-NH <sub>2</sub>	21
Nombre del compuesto	Estructura	EC <sub>50</sub> (µM)
(SEQ ID NO:56)	Ac-c(Mpa)arrar-NH <sub>2</sub>	21
(SEQ ID NO:57)	Ac-c(PEG2-C)arrar-NH <sub>2</sub>	2,3
(SEQ ID NO:58)	Ac-c(PEG5-C)rrrrrr-NH <sub>2</sub>	0,58
(SEQ ID NO:59)	Ac-c(PEG2-C)rrrrrr-NH <sub>2</sub>	0,02
(SEQ ID NO:34)	Ac-C(C)arrar-NH <sub>2</sub>	2,5
(SEQ ID NO:60)	c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	3,1
(SEQ ID NO:61)	Ac-bAla-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	2,6
(SEQ ID NO:62)	bAla-c(C)arrar	-
(SEQ ID NO:42)	Ac-cGrrrGr-NH <sub>2</sub>	12
(SEQ ID NO:63)	Ac-cGrrrGr	-
(SEQ ID NO:64)	Ac-cArrrAr	-
(SEQ ID NO:43)	Ac-cArrrAr-NH <sub>2</sub>	>1000
(SEQ ID NO:44)	Ac-CaRrRaR-NH <sub>2</sub>	5,6
(SEQ ID NO:65)	Ac-cvrrrvr-NH <sub>2</sub>	35
(SEQ ID NO:66)	Ac-cvrrrvr	-
(SEQ ID NO:67)	Ac-Crrrrrr-NH <sub>2</sub>	6,2
(SEQ ID NO:68)	Ac-carrrer-NH <sub>2</sub>	62
(SEQ ID NO:69)	Ac-cerrrar-NH <sub>2</sub>	31
(SEQ ID NO:72)	Ac-cakrrar-NH <sub>2</sub>	35
(SEQ ID NO:73)	Ac-carkrar-NH <sub>2</sub>	31
(SEQ ID NO:74)	Ac-carrar-OH	31

(SEQ ID NO:11)	Ac-crrrarr-NH <sub>2</sub>	5,9
(SEQ ID NO:12)	Ac-crrrrar-NH <sub>2</sub>	0,45
(SEQ ID NO:13)	Ac-crrrrra-NH <sub>2</sub>	1,1
(SEQ ID NO:75)	Ac-CARRRAR-NH <sub>2</sub>	58
(SEQ ID NO:76)	Ac-caarrrrrr-NH <sub>2</sub>	4,5
(SEQ ID NO:77)	Ac-caaarrrrrr-NH <sub>2</sub>	4,6
(SEQ ID NO:78)	Ac-carararar-NH <sub>2</sub>	5,3
(SEQ ID NO:29)	Ac-arrrar-NH <sub>2</sub>	>1000
(SEQ ID NO:79)	Ac-carrrarar-NH <sub>2</sub>	13
(SEQ ID NO:80)	crrrrrr-NH <sub>2</sub>	1,1
(SEQ ID NO:32)	Ac-dHcy rrrrrr-NH <sub>2</sub>	2
(SEQ ID NO:81)	Ac-c(Berizoyl)rrrrrr-NH <sub>2</sub>	3,6
(SEQ ID NO:82)	Ac-c(acetyl)rrrrrr-NH <sub>2</sub>	4,1

En otro estudio de la relación estructura-actividad, la contribución de los aminoácidos no catiónicos a la potencia de los péptidos se evaluó preparando una serie de péptidos con diversos residuos de D-aminoácidos o glicina (Tabla 6) o con aminoácidos no naturales estéricamente impedidos (Tabla 7), sustituidos en diversas posiciones en el péptido Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) y en el péptido Ac-crrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:153). Los péptidos se administraron como un bolo IV a ratas Sprague Dawley normales, a una dosis de 0,5 mg/kg. Se utilizó como un control un bolo intravenoso (IV) de solución salina. Los niveles de la PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación a 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación. Los resultados se muestran en las tablas a continuación, e indican que: 1) un aminoácido pequeño tal como alanina, glicina o serina se prefiere en la posición 6 en el péptido Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26), y 2) la alanina en la posición 2 en Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) es mucho más permisiva para las sustituciones y se puede sustituir con aminoácidos naturales hidrófobos (por ejemplo, D-Val, D-Leu), aromáticos (por ejemplo, D-Phe), o polares (por ejemplo, D-Ser, D-Gln), así como aminoácidos hidrófobos voluminosos no naturales (por ejemplo, dNle, dNva), pero no los ácidos, y que 3) el residuo de alanina en la posición 4 del péptido Ac-crrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) también es muy permisivo para las sustituciones y se puede adaptar a la mayoría de tipos de aminoácidos naturales (así como también aminoácidos hidrófobos voluminosos no naturales (por ejemplo DNle, dNva) aunque no es permisivo para los aminoácidos que afectan a la conformación secundaria, concretamente, glicina o prolina o los aminoácidos con cadena lateral ácida.

Tabla 6

Actividad de los compuestos peptídicos ejemplares		
SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto*	Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales** 0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina
Solución Salina	Solución Salina	100
SEQ ID NO:83	Ac-carrfr-NH <sub>2</sub>	177
SEQ ID NO:84	Ac-carrir-NH <sub>2</sub>	161
SEQ ID NO:85	Ac-carrlr-NH <sub>2</sub>	140
SEQ ID NO:68	Ac-carrre-NH <sub>2</sub>	81
SEQ ID NO:87	Ac-carrvr-NH <sub>2</sub>	79
SEQ ID NO:88	Ac-carrpr-NH <sub>2</sub>	76
SEQ ID NO:89	Ac-carrhr-NH <sub>2</sub>	48
SEQ ID NO:90	Ac-carrqr-NH <sub>2</sub>	41
SEQ ID NO:91	Ac-carrtr-NH <sub>2</sub>	18
SEQ ID NO:92	Ac-carrsr-NH <sub>2</sub>	6
SEQ ID NO:93	Ac-carrGr-NH <sub>2</sub>	5
SEQ ID NO:94	Ac-cerrrar-NH <sub>2</sub>	103
SEQ ID NO:95	Ac-cGrrrar-NH <sub>2</sub>	45
SEQ ID NO:96	Ac-cirrrar-NH <sub>2</sub>	33
SEQ ID NO:97	Ac-cprrrar-NH <sub>2</sub>	30
SEQ ID NO:98	Ac-clrrrar-NH <sub>2</sub>	26
SEQ ID NO:99	Ac-cqrrrar-NH <sub>2</sub>	24
SEQ ID NO:100	Ac-ctrrrar-NH <sub>2</sub>	23
SEQ ID NO:101	Ac-cvrrrar-NH <sub>2</sub>	19
SEQ ID NO:102	Ac-csrrrar-NH <sub>2</sub>	13
SEQ ID NO:103	Ac-chrrrar-NH <sub>2</sub>	1

SEQ ID NO:104	Ac-cfrrrar-NH <sub>2</sub>	0
SEQ ID NO:105	Ac-crr <b>G</b> rar-NH <sub>2</sub>	69
SEQ ID NO:106	Ac-crr <b>p</b> rar-NH <sub>2</sub>	68
SEQ ID NO:107	Ac-crr <b>e</b> rar-NH <sub>2</sub>	56
SEQ ID NO:108	Ac-crr <b>r</b> rar-NH <sub>2</sub>	13
SEQ ID NO:109	Ac-crr <b>h</b> rar-NH <sub>2</sub>	9
SEQ ID NO:110	Ac-crr <b>f</b> rar-NH <sub>2</sub>	6
SEQ ID NO:111	Ac-crr <b>s</b> rar-NH <sub>2</sub>	4
SEQ ID NO:112	Ac-crr <b>q</b> rar-NH <sub>2</sub>	4
SEQ ID NO:113	Ac-crr <b>v</b> rar-NH <sub>2</sub>	3
SEQ ID NO:114	Ac-crr <b>l</b> rar-NH <sub>2</sub>	1
SEQ ID NO:115	Ac-crr <b>r</b> rar-NH <sub>2</sub>	0

\*La fuente en negrita indica una sustitución respectiva de residuos de alanina en Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) o Ac-warar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25).  
 \*\* Reducción de PTH tras 0,5 mg/kg de administración IV en ratas normales anestesiadas con isoflurano - PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración y se calculó el AUC acumulada, Los datos de PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:  $AUC_{comp. tratado}/AUC_{control de solución salina} * 100$ .

Tabla 7

Actividad de los compuestos peptídicos ejemplares		
SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto*	Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales* 0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina**
Solución Salina	Solución Salina	100
SEQ ID NO:116	Ac-crr- <b>Sar</b> -rar-NH <sub>2</sub>	141
SEQ ID NO:117	Ac-carr- <b>Sar</b> -r-NH <sub>2</sub>	111
SEQ ID NO:118	Ac-c- <b>Nma</b> -rrr- <b>Nma</b> -r-NH <sub>2</sub>	105
SEQ ID NO:119	Ac-crrar- <b>Nma</b> -r-NH <sub>2</sub>	101
SEQ ID NO:120	Ac-c- <b>Aib</b> -rrr- <b>Aib</b> -r-NH <sub>2</sub>	94
SEQ ID NO:121	Ac-crr- <b>Nma</b> -rar-NH <sub>2</sub>	86
SEQ ID NO:122	Ac-carr- <b>Nma</b> -r-NH <sub>2</sub>	74
SEQ ID NO:123	Ac-c- <b>Aib</b> -rrrar-NH <sub>2</sub>	70
SEQ ID NO:124	Ac-carr- <b>Aib</b> -r-NH <sub>2</sub>	68
SEQ ID NO:125	Ac-c- <b>Sar</b> -rrr- <b>Sar</b> -r-NH <sub>2</sub>	65
SEQ ID NO:126	Ac-crrar- <b>Sar</b> -r-NH <sub>2</sub>	62
SEQ ID NO:127	Ac-c- <b>Nma</b> -rrrar-NH <sub>2</sub>	56
SEQ ID NO:128	Ac-c- <b>Sar</b> -rrrar-NH <sub>2</sub>	50
SEQ ID NO:129	Ac-carr- <b>Nle</b> -r-NH <sub>2</sub>	64
SEQ ID NO:130	Ac-c- <b>dNle</b> -rrr- <b>dNle</b> -r-NH <sub>2</sub>	54
SEQ ID NO:131	Ac-carr- <b>dNva</b> -r-NH <sub>2</sub>	54
SEQ ID NO:132	Ac-c- <b>dNva</b> -rrr- <b>dNva</b> -r-NH <sub>2</sub>	27
SEQ ID NO:133	Ac-crrar- <b>dNle</b> -r-NH <sub>2</sub>	26
SEQ ID NO:134	Ac-c- <b>dNle</b> -rrrar-NH <sub>2</sub>	10
SEQ ID NO:135	Ac-crrar- <b>dNva</b> -r-NH <sub>2</sub>	8
SEQ ID NO:136	Ac-c- <b>dNva</b> -rrrar-NH <sub>2</sub>	7
SEQ ID NO:137	Ac-crr- <b>dNva</b> -rar-NH <sub>2</sub>	3
SEQ ID NO:138	Ac-crr- <b>dNle</b> -rar-NH <sub>2</sub>	3

\*La fuente en negrita indica una sustitución respectiva de residuos de alanina en Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) o Ac-crrarar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25). Sar = el aminoácido no natural Sarcosina, Nma = N-metil alanina; Aib = aminoácido isobutírico; dNva = D-Norvalina; dNle = D-Norleucina  
 \*\*Reducción de PTH tras 0,5 mg/kg de administración IV en ratas normales anestesiadas con isoflurano - PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración y se calculó el AUC acumulada. Los datos de PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:  $AUC_{comp. tratado}/AUC_{control de solución salina} * 100$ .

Tabla 8

Actividad de los compuestos peptídicos ejemplares		
---	--	--

SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto*	Actividad <i>in vivo</i> en ratas normales** 0,5 mg/kg de bolo IV % de AUC de PTH de control de solución salina
Solución Salina	Solución Salina	100
SEO ID NO:97	Ac-c( <b>C</b> )arrar-NH <sub>2</sub>	8
SEQ ID NO:101	Ac-c( <b>GS</b> )rrrrr-NH <sub>2</sub>	12
SEQ ID NO:139	Ac-c( <b>dHcy</b> )arrar-NH <sub>2</sub>	32
SEQ ID NO:140	Ac-c( <b>Mpa</b> )arrar-NH <sub>2</sub>	25
SEQ ID NO:141	Ac-c( <b>Ac-C</b> )arrar-NH <sub>2</sub>	38
SEQ ID NO:142	Ac-c( <b>c</b> )arrar-NH <sub>2</sub>	0
SEQ ID NO:143***	Ac-c( <b>C-PEG20</b> )rrrrr-NH <sub>2</sub>	25
SEQ ID NO:144****	Ac-c( <b>C-PEG40</b> )rrrrr-NH <sub>2</sub>	15
SEQ ID NO:145	<pre>           CEEEEEE                     Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub>           </pre>	40
SEQ ID NO:145 SEQ ID NO:26	<pre>           CEEEEEE                     Ac-carrar-NH<sub>2</sub>           </pre>	42
SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:25	<pre>         Ac-crrrarar-NH<sub>2</sub>                     Ac-crrrarar-NH<sub>2</sub>           </pre>	2
SEQ ID NO:26 SEQ ID NO:26	<pre>         Ac-carrar-NH<sub>2</sub>                     Ac-carrar-NH<sub>2</sub>           </pre>	1
<p>*La fuente en negrita mostrada entre paréntesis indica los grupos de conjugación que contienen tiol respectivos. GS = glutatión oxidado; dHcy = D-homocisteína; Mpa = Ácido mercaptopropiónico; PEG = polietilenglicol.  ** Reducción de PTH tras 0,5 mg/kg de administración IV en ratas normales anestesiadas con isoflurano - PTH se midió 1, 2, 3 y 4 horas tras la administración y se calculó el AUC acumulada. Los datos de PTH se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: <math>AUC_{comp. tratado} / AUC_{control de solución salina} * 100</math>.  ***El compuesto se dosificó a 10 mg/kg (~ molaridad equivalente a un péptido no PEGilado de 0,5 mg/kg)  ****El compuesto se dosificó a 20 mg/kg (~ molaridad equivalente a un péptido no PEGilado de 0,5 mg/kg)</p>		

B. Respuesta a histamina y estudios de la relación estructura-actividad

- En la bibliografía se han indicado compuestos policatiónicos para provocar la liberación de la amina histamina biogénica activa. Véase, Church y col., J. Immunol., 128(5): 2116-2121 (1982); Lagunoff y col., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23: 331-51 (1983). Se cree que la liberación de histamina es el resultado de la activación de mastocitos y basófilos que se produce de una forma dependiente de Gai. Véase, Aridor y col., J. Cell Biol., 111(3): 909-17 (1990). La reducción o eliminación de esta reacción fisiológica es deseable, entre otros, para mejorar el margen terapéutico de los calcimiméticos de péptidos catiónicos para el tratamiento de SHPT.
- 10 Se realizaron estudios para evaluar la liberación de histamina inducida tras la administración *in vivo* de los compuestos descritos en el presente documento. En un primer estudio, descrito en el Ejemplo 6, se utilizó una dosificación mediante bolo IV o infusión en ratas Sprague Dawley normales para evaluar la liberación de histamina asociada a diversos compuestos. Para evaluar el efecto de la carga neta positiva sobre la liberación de histamina
- 15 asociada a un compuesto, se generaron y se ensayaron péptidos que contenían de 4 a 7 residuos catiónicos (arginina) para determinar su capacidad para provocar la liberación de histamina *in vivo*, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Los péptidos ensayaos incluían (i) Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4), (ii) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5), (iii) Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y (iv) Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41).

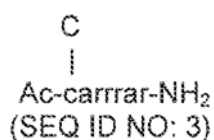
Como se muestra en la figura 3, cuando un número equivalente de moles de cada péptido se administró mediante bolo IV a ratas normales, la SEQ ID NO:41 (8 residuos de arginina) exhibió la mayor inducción de histamina. Otros compuestos con menos residuos Arg, incluyendo la SEQ ID NO:6 (6 residuos de arginina), la SEQ ID NO:5 (5 residuos de arginina), y la SEQ ID NO:4 (4 residuos de arginina), también produjeron un máximo en el nivel de histamina, aunque a un menor grado en comparación con la SEQ ID NO:41, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:5 y la SEQ ID NO:4, que generaron respuestas más leves en su actividad de liberación de histamina (~2-3 veces superior al valor inicial). La SEQ ID NO:5 y la SEQ ID NO:4 fueron, sin embargo, menos potentes que la SEQ ID NO:6 con respecto a la disminución de la PTH en plasma.

10

Debido a que la actividad de reducción de PTH de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se acompañó por la falta de una respuesta histamínica, se realizaron evaluaciones adicionales en base a Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) para evaluar si fue posible o no disminuir adicionalmente la respuesta histamínica sin sacrificar la actividad de reducción de PTH. Como se mostrará en los datos a continuación, la sustitución de los residuos catiónicos (arginina) en Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) con residuos no catiónicos (alanina) se realizó para producir una serie de análogos con una carga neta reducida total y una densidad de carga reducida. De estos análogos, tanto CA-cararr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:15) como Ac-carrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) se asociaron a la falta de una respuesta histamínica cuando se administraron a ratas mediante bolo IV. De manera importante, estos dos péptidos conservaron sus propiedades calcimiméticas potentes y fueron capaces de reducir la secreción de la PTH tanto en ratas normales como en ratas con disfunción renal.

El compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> identificado como la SEQ ID NO:6 (2,1 µmol/kg = 2,3 mg/kg) provocó una respuesta histamínica observable de aproximadamente 2-3 veces sobre la del valor inicial en comparación con 6-9 veces con la SEQ ID NO:41 cuando se dosificó mediante bolo IV (administrado en menos de 1 minuto) en ratas normales. La liberación de histamina provocada por Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) llegó a un máximo a los 5 minutos después de la dosificación y regresó a los niveles iniciales 15 minutos después (figura 3). Una reducción adicional en el número de subunidades cargadas para 5 y 4 residuos de arginina por péptido (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:4, respectivamente) redujo adicionalmente la respuesta histamínica en comparación con los péptidos de oligo-arginina más largos; sin embargo, se observó un aumento de 2-3 veces en la histamina sobre el valor inicial 5 minutos después de la dosificación en bolo IV (figura 3). Estos resultados sugieren una relación entre la carga neta del péptido y la liberación asociada de histamina. También se aprecia que los péptidos ricos en arginina con menos de 7 argininas están bastante limitados en su capacidad para entrar en las células, lo que sugiere que la penetración celular no se requiere para provocar una liberación de histamina.

La liberación de histamina asociada a los compuestos de reducción de la PTH Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se evaluó *in vivo*. El compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) tiene la siguiente estructura:



40

Esta estructura conjugado se representa en el presente documento como Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO.273 donde el residuo L-Cys unido al residuo que contiene tiol en la subunidad X<sub>1</sub> del compuesto (aquí, un residuo D-Cys) a través de un enlace disulfuro Cys-Cys, se coloca entre paréntesis en la fórmula. Esta notación se utiliza a lo largo del documento para designar que el resto entre paréntesis está unido a un segundo grupo que contiene tiol. Con respecto a Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), el compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) tiene dos residuos catiónicos (arginina) sustituidos con residuos no cargados (alanina) en las posiciones subunitarias X<sub>2</sub> y X<sub>6</sub>. Además, el residuo D-Cys en la posición X<sub>1</sub> está conjugado a un residuo L-Cys.

Estos dos compuestos se administraron a ratas anestesiadas con isoflurano (Sprague Dawley) a 3 mg/kg mediante bolo intravenoso (IV) (administrado en menos de 1 minuto). Se extrajo sangre antes de la dosificación y 5, 15 y 30 minutos después de la dosificación. Se midió la concentración de histamina, y el cambio de veces en la concentración de histamina en sangre con relación a la concentración de histamina en sangre previa a la dosis se muestra en la figura. 4. El compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, barras de color blanco) indujo una respuesta histamínica, observada en el punto de datos 5 minutos después de la dosificación donde se observó un aumento de 7 veces en el nivel de histamina. El compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3, con barras sombreadas) no indujo

55

una respuesta histamínica evidente, como se observa por los puntos de datos a los 5, 10 y 15 minutos después de la dosificación donde el nivel de histamina no se aumentó con relación al nivel de histamina de pre-dosificación (tiempo cero).

- 5 Para evaluar adicionalmente la relación entre la estructura del compuesto y la liberación de histamina, se preparó una serie de compuestos y se evaluó para su capacidad para provocar la inducción de histamina en un ensayo *in vitro* utilizando mastocitos peritoneales de rata. En este ensayo, los compuestos se incuban en 10  $\mu$ M durante 15 minutos a 37 °C con células aisladas del lavado peritoneal de ratas SD. Después de la incubación, el medio celular se recoge y se determina el nivel de histamina. Los datos se muestran en la Tabla 9.

10

Tabla 9

Inducción de histamina <i>in vitro</i> en mastocitos peritoneales de rata de compuestos peptídicos ejemplares		
SEQ ID NO.	Secuencia del Compuesto	*Cambio en veces de histamina <i>in vitro</i> de no tratado a 10 $\mu$ M*
Solución Salina	Solución Salina	1,0
SEQ ID NO:6	Ac-crrrrr-NH <sub>2</sub>	11,5
SEQ ID NO:8	Ac-carrrrr-NH <sub>2</sub>	6,6
SEQ ID NO:9	Ac-crarrrr-NH <sub>2</sub>	6,8
SEQ ID NO:10	Ac-crrarr-NH <sub>2</sub>	5,3
SEQ ID NO:11	Ac-crrrarr-NH <sub>2</sub>	5,0
SEQ ID NO:12	Ac-crrrrar-NH <sub>2</sub>	5,0
SEQ ID NO:13	Ac-crrrrra-NH <sub>2</sub>	4,1
SEQ ID NO:15	Ac-cararr-NH <sub>2</sub>	2,5
SEQ ID NO:22	Ac-caarrrr-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:17	Ac-crraar-NH <sub>2</sub>	1,3
SEQ ID NO:146	Ac-crrrraa-NH <sub>2</sub>	1,9
SEQ ID NO:26	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	1,4
SEQ ID NO:3	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	0,6
SEQ ID NO:16	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	1,4
SEQ ID NO:19	Ac-carrrra-NH <sub>2</sub>	1,3
SEQ ID NO:23	Ac-crarrar-NH <sub>2</sub>	1,5
SEQ ID NO:18	Ac-crarrar-NH <sub>2</sub>	1,4
SEQ ID NO:20	Ac-crarrra-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:25	Ac-crrrar-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:14	Ac-crrarra-NH <sub>2</sub>	1,6
SEQ ID NO:130	Ac-c-dNle-rrr-dNle-r-NH <sub>2</sub>	9,2
SEQ ID NO:132	Ac-c-dNva-rrr-dNva-r-NH <sub>2</sub>	4,1
SEQ ID NO:28	Ac-c(C)rrrarar-NH <sub>2</sub>	0,7
SEQ ID NO:24	Ac-craarr-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:21	Ac-crrraar-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:134	Ac-c-dNle-rrrar-NH <sub>2</sub>	2,2
SEQ ID NO:129	Ac-carr-dNle-r-NH <sub>2</sub>	2,6
SEQ ID NO:136	Ac-c-dNva-rrrar-NH <sub>2</sub>	2,1
SEQ ID NO:131	Ac-carr-dNva-r-NH <sub>2</sub>	1,8
SEQ ID NO:133	Ac-crrar-dNle-r-NH <sub>2</sub>	4,3
SEQ ID NO:135	Ac-crrar-dNva-r-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:95	Ac-cGrrar-NH <sub>2</sub>	1,5
SEQ ID NO:99	Ac-cqrrar-NH <sub>2</sub>	1,9

ES 2 607 954 T3

SEQ ID NO:103	Ac-chrrrar-NH <sub>2</sub>	1,6
SEQ ID NO:96	Ac-cirrrar-NH <sub>2</sub>	3,0
SEQ ID NO:98	Ac-clrrrar-NH <sub>2</sub>	2,2
SEQ ID NO:97	Ac-cprrrar-NH <sub>2</sub>	0,8
SEQ ID NO:102	Ac-csrrrar-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:100	Ac-ctrrrar-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:101	Ac-cvrrrar-NH <sub>2</sub>	1,5
SEQ ID NO:93	Ac-carrGr-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:90	Ac-carrqr-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:89	Ac-carrhr-NH <sub>2</sub>	2,0
SEQ ID NO:84	Ac-carrir-NH <sub>2</sub>	1,8
SEQ ID NO:85	Ac-carrlr-NH <sub>2</sub>	2,5
SEQ ID NO:88	Ac-carrpr-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:92	Ac-carrsr-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:91	Ac-carrtr-NH <sub>2</sub>	1,7
SEQ ID NO:87	Ac-carrvr-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:147	Ac-cakkkak-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:72	Ac-cakrrar-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:73	Ac-carkrar-NH <sub>2</sub>	1,4
SEQ ID NO:105	Ac-crrGrar-NH <sub>2</sub>	1,8
SEQ ID NO:112	Ac-crrqrar-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:109	Ac-crrhrar-NH <sub>2</sub>	2,3
SEQ ID NO:115	Ac-crrirar-NH <sub>2</sub>	3,4
SEQ ID NO:114	Ac-crrlrar-NH <sub>2</sub>	4,5
SEQ ID NO:106	Ac-crrprar-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:111	Ac-crrsrar-NH <sub>2</sub>	2,0
SEQ ID NO:108	Ac-crrtrar-NH <sub>2</sub>	1,2
SEQ ID NO:113	Ac-crrvvar-NH <sub>2</sub>	1,9
SEQ ID NO:104	Ac-cfrrrar-NH <sub>2</sub>	6,8
SEQ ID NO:83	Ac-carrfr-NH <sub>2</sub>	4,0
SEQ ID NO:68	Ac-carrrer-NH <sub>2</sub>	1,3
SEQ ID NO:110	Ac-crrfrar-NH <sub>2</sub>	6,2
SEQ ID NO:107	Ac-crrerar-NH <sub>2</sub>	0,6
SEQ ID NO:86	Ac-carrkar-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:70	Ac-carrrak-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:148	Ac-cararar-NH <sub>2</sub>	0,6

SEQ ID NO:25	$\begin{array}{c} \text{Ac-crrrarar-NH}_2 \\   \\ \text{Ac-carrar-NH}_2 \end{array}$	9,3
SEQ ID NO:149	Ac-crrrarGr-NH <sub>2</sub>	1,6
SEQ ID NO:150	Ac-crrrarqr-NH <sub>2</sub>	1,6
SEQ ID NO:151	Ac-crrrarhr-NH <sub>2</sub>	2,5
SEQ ID NO:152	Ac-crrrarir-NH <sub>2</sub>	4,1
SEQ ID NO:153	Ac-ca(DAP)rrrar-NH <sub>2</sub>	1,6
SEQ ID NO:154	Ac-ca(dHar)(dHar)(dHar)ar-NH <sub>2</sub>	2,7
*Método expuesto en el Ejemplo 7 Abreviaturas: Véase el Ejemplo 7		

Para evaluar adicionalmente la relación entre la estructura del compuesto y la liberación de histamina, se preparó una serie de compuestos evaluados para determinar su capacidad para provocar la inducción de histamina en ensayos *in vivo*. Los datos se muestran en la Tabla 10.

5

Tabla 10

<u>Inducción de histamina <i>in vivo</i> de compuestos peptídicos ejemplares</u>		
SEQ ID NO.	Estructura del Compuesto	* Respuesta histamínica <i>in vivo</i> Cambio en veces a partir de niveles previos a la dosis 5' después de la inyección de 2 mg/kg de bolo IV
Solución Salina	Solución Salina	1,0
SEQ ID NO:6	Ac-crrrrr-NH <sub>2</sub>	2,7
SEQ ID NO:26	Ac-carrar-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:25	Ac-crrrarar-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:15	Ac-cararr-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:18	Ac-crararr-NH <sub>2</sub>	1,1
SEQ ID NO:20	Ac-crarrra-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:19	Ac-carrrra-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:23	Ac-crarrar-NH <sub>2</sub>	0,8
SEQ ID NO:18	Ac-crararr-NH <sub>2</sub>	1,0
SEQ ID NO:27	Ac-c(C)arrar-NH <sub>2</sub>	0,9
SEQ ID NO:28	Ac-c(C)rrrarar-NH <sub>2</sub>	0,9
*Método expuesto en el Ejemplo 7.		

Por consiguiente, y como se puede apreciar en vista de los datos de la PTH y los datos de histamina descritos anteriormente en el presente documento, en una realización, se contempla un compuesto que tiene actividad para



disminuir el nivel de la PTH en un sujeto en ausencia de una respuesta histamínica. En ciertas realizaciones, la ausencia de una respuesta histamínica significa una dosis del compuesto que produce un aumento en histamina menor a 10 veces, más preferiblemente 8 veces, aún más preferiblemente 5 veces, e incluso más preferiblemente 3 veces, medido *in vitro* en un ensayo como se describe en el presente documento, donde el cambio de veces se determina en base a los niveles de histamina antes de la incubación con el compuesto y después de 15 minutos de la incubación con el compuesto. En una realización específica, la respuesta histamínica se determina en un ensayo *in vitro* utilizando mastocitos peritoneales de rata aislados del lavado peritoneal de ratas Sprague Dawley normales, y donde el cambio de veces se determina en base a los niveles de histamina antes de la incubación con el compuesto y después de 15 minutos de la incubación con el compuesto. En los estudios realizados en el presente documento, se realizó la evaluación *in vitro* de la liberación de histamina utilizando mastocitos peritoneales aislados de rata, aislados mediante lavado peritoneal utilizando HBSS frío + HEPES 25 mM pH 7,4 que contenía heparina (5 u/ml). Las células se lavaron dos veces en tampón de estimulación (HBSS + HEPES 25 mM, pH 7,4) y se incubaron con 10  $\mu$ M del compuesto en tampón de estimulación (HBSS + HEPES 25 mM, pH 7,4) durante 15 minutos en una placa de 96 pocillos (106/pocillo) a 37 °C. El sobrenadante celular se analizó para determinar la histamina utilizando el kit de histamina de EIA (Cayman # 589651).

En otra realización, se contempla un compuesto que tiene una actividad para disminuir el nivel de la PTH en un sujeto en ausencia de una respuesta histamínica clínica. Como se usa en el presente documento, la ausencia de una "respuesta histamínica clínica" significa que una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según se describe en el presente documento se administra al sujeto sin producir un aumento clínicamente adverso en la histamina en plasma o sangre según se mide 5-10 minutos después de terminar la dosificación o durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, cuando un compuesto requerido para producir un efecto terapéutico deseado se administra a un sujeto mediante bolo (como se usa en el presente documento, "bolo" significa administrado durante un minuto o menos) produjo un aumento en la histamina en plasma o sangre 5-10 minutos después de terminar la dosificación que es menor de 15 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces por encima de los niveles de la pre-dosis.

Como se puede apreciar a partir de los estudios descritos anteriormente, en una realización de la divulgación, el compuesto comprende una secuencia de 3 a 35 residuos de aminoácidos, donde está presente en la secuencia una pluralidad de subunidades de residuos de aminoácidos cargados positivamente. En algunas realizaciones de la divulgación, los compuestos descritos comprenden de 5 a 25 subunidades, y en una realización preferida, cada subunidad es un residuo de aminoácido. En otras realizaciones de la divulgación, los compuestos descritos comprenden de 6 a 12 subunidades. Todavía en otras realizaciones de la divulgación, los compuestos descritos comprenden de 3 a 9 subunidades de aminoácidos. En realizaciones alternativas de la divulgación, los compuestos descritos comprenden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 subunidades.

Las subunidades de los compuestos descritos, en una realización, se seleccionan independientemente de aminoácidos naturales o no naturales, o sus análogos, y pueden tener cualquier configuración L- o D- (excepto para glicina que es aquiral). Glicina, los residuos alifáticos alanina, valina, leucina, o isoleucina, prolina, los residuos hidroxilo, serina y treonina, los residuos ácidos aspártico y ácido glutámico, los residuos amida, asparagina, y glutamina, los residuos básicos lisina y arginina, histidina, los residuos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, y los residuos que contienen azufre, metionina y cisteína, se contemplan todos para su uso en los compuestos descritos. El número de subunidades cargadas positivamente, y su densidad pueden afectar la potencia del compuesto para reducir la PTH. En algunas realizaciones, las subunidades cargadas positivamente se separan mediante una o más de otras subunidades ("subunidades de separación"). En una realización, las subunidades de separación son residuos de alanina. En algunas realizaciones, la quiralidad de la subunidad de separación afecta la potencia del compuesto.

Los residuos de aminoácidos cargados positivamente de los compuestos descritos pueden ser un residuo natural o no natural específico, o un análogo del mismo, que tenga cualquiera de la configuración L- o D- (por ejemplo, L-arginina) que se repite en la secuencia, o puede ser una diversidad de residuos naturales o no naturales, o análogos de los mismos, que tengan cualquier configuración L- o D-. En algunas realizaciones, el compuesto es un péptido que consta de 3 a 20 residuos de aminoácidos cargados positivamente, 6 a 12 residuos de aminoácidos cargados positivamente, 3 a 9 residuos de aminoácidos cargados positivamente. En algunas realizaciones, los péptidos comprenden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aminoácidos cargados positivamente.

En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos cargados positivamente se seleccionan independientemente

de aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos cargados positivamente se seleccionan independientemente de aminoácidos naturales y/o no naturales. En algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos cargados positivamente se seleccionan independientemente del grupo que consiste en arginina, lisina, histidina, ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ornitina y homoarginina. En una realización preferida, los residuos de aminoácidos cargados positivamente son residuos de arginina.

En algunas realizaciones, el compuesto es un péptido y es una cadena o ramificación de un péptido contiguo individual. En otras realizaciones, el compuesto es un péptido que está ramificado. Aún en otras realizaciones, el péptido se conjuga con uno o más restos que contienen tiol (cada uno, un "grupo de conjugación que contiene tiol" o un "grupo de conjugación"). En una realización preferida, y como se ilustra simplemente, el compuesto peptídico se conjuga con un grupo de conjugación Cys, a través de un enlace disulfuro (-S-S-), (por ejemplo, -Cys-Cys-). Como se usa en el presente documento, el término "compuesto" pretende incluir tanto estos péptidos como estos conjugados.

Los compuestos comprenden típicamente uno o más restos de tiol, preferiblemente uno o más restos de tiol reactivo. Las subunidades que tienen un grupo tiol incluyen compuestos que no son de aminoácido que tienen un grupo tiol y los aminoácidos con un grupo tiol. El grupo tiol de la subunidad que contiene tiol puede estar en una forma conjugada (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro con un grupo de conjugación) o en una forma sin conjugar (es decir, como un tiol reducido). En una realización preferida, cuando el grupo tiol está en una forma no conjugada o una forma conjugada, es capaz de formar un enlace disulfuro con un grupo que contiene tiol. El residuo que contiene tiol se puede ubicar en cualquier posición a lo largo de la cadena peptídica, incluyendo el extremo amino, el extremo carboxi, o alguna otra posición. En una realización preferida, el residuo que contiene tiol o la subunidad se pueden ubicar en el extremo amino. En otras realizaciones, el residuo tiol o la subunidad se pueden ubicar en el extremo carboxi o dentro de la secuencia peptídica.

Algunos ejemplos representativos de residuos que contienen tiol incluyen, sin limitación, cisteína, ácido mercaptopropiónico, homo-cisteína, y penicilamina. Cuando el residuo que contiene tiol contiene un centro quiral, puede estar presente en la configuración L- o D-. En una realización preferida, el residuo que contiene tiol es cisteína.

En algunas realizaciones, la reticulación entre la subunidad que contiene tiol en la posición  $X_1$  en el compuesto y el grupo de conjugación que contiene tiol se pueden escindir y/o intercambiar con otros grupos de conjugación que contienen tiol tales como cisteína (por ejemplo, mediante reducción del enlace disulfuro) *in vivo* para producir una forma biológicamente activa del compuesto. De esta forma, el conjugado puede funcionar como una pro-fármaco del compuesto. Un grupo de conjugación también se puede utilizar para modificar las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de los compuestos descritos (por ejemplo, la conjugación a través de un enlace disulfuro a un resto PEGilado grande para mejorar la farmacocinética).

En algunas realizaciones, el compuesto es un péptido que consta de la secuencia aminoacídica  $(X_{aa1})-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})-(SEQ\ ID\ NO:155)$ , donde  $(X_{aa1})$  es un residuo aminoacídico que contiene tiol,  $(X_{aa2})$  es un residuo aminoacídico no catiónico,  $(X_{aa3})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa4})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa5})$  es un residuo aminoacídico catiónico,  $(X_{aa6})$  es un residuo no catiónico, y  $(X_{aa7})$  es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede modificarse en el extremo N, el extremo C, o ambos. En una realización preferida, el péptido está modificado tanto en el extremo N como el extremo C por acetilación y amidación, respectivamente.

En algunas realizaciones, un péptido comprende la secuencia aminoacídica  $(D-Cys)-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})$  (SEQ ID NO:156), donde  $(X_{aa2})$  es un residuo aminoacídico no catiónico,  $(X_{aa3})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa4})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa5})$  se selecciona del grupo que consiste en D-Arg, L-Arg, D-Lys y L-Lys,  $(X_{aa6})$  es un residuo no catiónico, y  $(X_{aa7})$  es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal.

En algunas realizaciones, un péptido comprende la secuencia aminoacídica  $(D-Cys)-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})$  (SEQ ID NO:157), donde  $(X_{aa2})$ ,  $(X_{aa3})$  y  $(X_{aa4})$  son, independientemente, cualquier residuo aminoacídico (pero en una realización preferida se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en D-Ala, D-Val, D-Leu, D-NorVal y D-NorLeu),  $(X_{aa5})$  y  $(X_{aa7})$  son, independientemente, cualquier residuo aminoacídico catiónico (pero en una realización preferida se seleccionan, independientemente, del grupo que consiste en D-Arg, L-Arg, D-Lys y L-Lys),  $(X_{aa6})$  es un residuo aminoacídico no catiónico (en una realización preferida, seleccionado del

grupo que consiste en D-Ala, D-Val, D-Leu, D-NorVal y D-NorLeu). El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal.

5 En algunas realizaciones, un péptido comprende la secuencia aminoacídica (D-Cys)-(X<sub>aa2</sub>)-(X<sub>aa3</sub>)-(X<sub>aa4</sub>)-(X<sub>aa5</sub>)-(X<sub>aa6</sub>)-(X<sub>aa7</sub>) (SEQ ID NO:158), donde (X<sub>aa2</sub>) es un residuo aminoacídico no catiónico, (X<sub>aa3</sub>) es cualquier residuo aminoacídico, (X<sub>aa4</sub>) es cualquier residuo aminoacídico, (X<sub>aa5</sub>) se selecciona del grupo que consiste en D-Arg, L-Arg, D-Lys y L-Lys, (X<sub>aa6</sub>) es un residuo no catiónico, y (X<sub>aa7</sub>) es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto  
10 una protección N-terminal como una protección C-terminal.

En algunas realizaciones, un péptido comprende la secuencia aminoacídica (D-Cys)-(D-Ala)-(X<sub>aa3</sub>)-(X<sub>aa4</sub>)-(D-Arg)-(D-Ala)-(X<sub>aa7</sub>) (SEQ ID NO:159), donde (X<sub>aa3</sub>) es cualquier residuo aminoacídico catiónico, (X<sub>aa4</sub>) es cualquier residuo aminoacídico catiónico, y (X<sub>aa7</sub>) es cualquier residuo aminoacídico catiónico. El péptido puede tener una  
15 protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal.

En algunas realizaciones, un péptido comprende la secuencia aminoacídica (D-Cys)-(X<sub>aa2</sub>)-(X<sub>aa3</sub>)-(D-Ala)-(D-Arg)-(D-Ala)-(X<sub>aa7</sub>) (SEQ ID NO:160), donde (X<sub>aa2</sub>), (X<sub>aa3</sub>) y (X<sub>aa7</sub>) son, independientemente, cualquier residuo  
20 aminoacídico catiónico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal.

Otra realización es un péptido calcimimético, que comprende una secuencia de aminoácidos unida a los enlaces peptídicos, donde la secuencia comprende de 5 a 10 residuos de aminoácido, y donde la secuencia comprende un  
25 extremo amino, un extremo carboxi, al menos un residuo que contiene tiol y de 3 a 9 residuos cargados positivamente. En una realización, al menos un residuo que contiene tiol es un residuo de cisteína. En otro aspecto, el residuo de cisteína se coloca en el extremo amino del péptido, en cierta realización, el residuo de cisteína es un residuo L-Cys, un residuo D-Cys, o un residuo L- o D-homoCys. En otras realizaciones, los residuos de aminoácido del péptido son D-aminoácidos o L-aminoácidos.

30 También se abarcan dentro del alcance de los compuestos reivindicados las moléculas peptidomiméticas que comprenden aproximadamente siete subunidades, donde al menos una subunidad contiene un resto tiol, de preferencia un resto tiol reactivo, y otras subunidades son una pluralidad de subunidades no catiónicas, y de 1 a 4 subunidades cargadas positivamente. Estas moléculas peptidomiméticas pueden comprender enlaces no peptídicos  
35 entre dos o más de las subunidades. Las diversas características de los compuestos analizados anteriormente se aplican en general a la molécula peptidomimética. Por ejemplo, como se ha analizado anteriormente, las subunidades utilizadas para construir las moléculas pueden ser aminoácidos de origen natural, o residuos con cadenas laterales no naturales, los extremos de los módulos pueden estar protegidos o sin proteger de la forma analizada anteriormente. De manera similar, los residuos de aminoácidos de la molécula pueden ser los residuos de  
40 L- o D-aminoácidos. También como se ha analizado anteriormente, los residuos que contienen tiol pueden estar en una forma reducida u oxidada con cualquiera de los restos que contienen tiol analizados anteriormente.

Se han desarrollado muchas estructuras peptidomiméticas y los métodos para su síntesis (Babine, R. E.; Bender, S. L., Chem. Rev., 97:1359, 1997; Hanessian, S.; y col., Tetrahedron, 53:12789, 1997; Fletcher, M. D.; Cambell, M. C.,  
45 Chem. Rev., 98:763, 1998); Peptidomimetics Protocols; Kazmierski W.M., Ed.; Methods in Molecular Medicine Series, Vol. 23; Humana Press, Inc.; Totowa, N.J. (1999).

### Conjugados

50 En algunas realizaciones, el compuesto se reticula químicamente a un grupo de conjugación que contiene tiol a través de un enlace disulfuro entre el tiol del compuesto y un tiol del grupo de conjugación. El grupo de conjugación que contiene tiol puede ser una molécula pequeña, tal como cisteína, o una macromolécula, tal como un polipéptido que contiene un residuo de cisteína. Los ejemplos de grupos de conjugación que contienen tiol adecuados incluyen tiol modificado con cisteína, glutatión, tioalquilo, restos tales como tiobencilo, ácido mercaptopropiónico, cisteína N-  
55 acetilada, cisteamida, N-acetilcisteamida, homocisteína, penicilamina y poli(etilenglicol) (PEG) (denominados como "PEGilado") tales como cisteína PEGilada o una duplicación del compuesto (es decir, para formar un homodímero unido mediante un enlace disulfuro). En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol es cisteína. Otros homólogos de cisteína también se contemplan para su uso como grupos de conjugación que contienen tiol, ya sea solos o que consten de un grupo de conjugación mayor. De forma similar, los estereoisómeros

de cisteína, homocisteína, y cisteamida son adecuados para su uso como restos que contienen tiol. Los grupos de conjugación se pueden utilizar para mejorar la estabilidad química y, por lo tanto, la semivida de un producto farmacéutico. En ciertas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales (es decir, el conjugado es un dímero), que mostró inesperadamente muy buena estabilidad química en comparación con el grupo de conjugación heterólogo tal como cisteína. Sin desear quedar ligado a la teoría, presumiblemente, cuando el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales, entonces cualquier desproporción (por ejemplo, la mezcla del grupo de conjugación) reconstituirá el compuesto dimérico original. Por el contrario, la desproporción de un compuesto con un grupo de conjugación heterólogo tal como cisteína puede conducir a la formación de homodímeros del péptido más cisteína (cisteína - homodímero de cisteína), más el compuesto precursor residual. Un homodímero del péptido (es decir, el grupo de conjugación y el péptido son iguales) se convertirá en una forma conjugada de cisteína del péptido *in vivo* debido a la alta concentración de la cisteína reducida en la circulación sistémica.

En algunas realizaciones, las enseñanzas incluyen un conjugado de disulfuro de un grupo de conjugación que contiene tiol y un péptido que comprende la secuencia aminoacídica  $(X_{aa1})-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})$  (SEQ ID NO:155), donde  $(X_{aa1})$  es un residuo aminoacídico con un resto que contiene tiol,  $(X_{aa2})$  es un residuo aminoacídico no catiónico,  $(X_{aa3})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa4})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa5})$  es un residuo aminoacídico catiónico,  $(X_{aa6})$  es un residuo no catiónico, y  $(X_{aa7})$  es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol se selecciona del grupo que consiste en D-Cys, L-Cys, un péptido que contiene D-Cys, y un péptido que contiene L-Cys. Cuando el grupo de conjugación que contiene tiol es un aminoácido o un péptido, puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol es un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:155. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales (es decir, el conjugado es un dímero).

En algunas realizaciones, las enseñanzas incluyen un conjugado de un grupo de conjugación que contiene tiol y un péptido que comprende la secuencia aminoacídica  $(D-Cys)-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})$  (SEQ ID NO:156), donde  $(X_{aa2})$  es un residuo aminoacídico no catiónico,  $(X_{aa3})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa4})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa5})$  se selecciona del grupo que consiste en D-Arg, L-Arg, D-Lys y L-Lys,  $(X_{aa6})$  es un residuo no catiónico, y  $(X_{aa7})$  es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol se selecciona del grupo que consiste en D-Cys, L-Cys, un péptido que contiene D-Cys, y un péptido que contiene L-Cys. Cuando el grupo de conjugación que contiene tiol es un aminoácido o un péptido, puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol es un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:156. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales (es decir, el conjugado es un dímero).

En algunas realizaciones, las enseñanzas incluyen un conjugado de un grupo de conjugación que contiene tiol y un péptido que comprende la secuencia aminoacídica  $(L-Cys)-(X_{aa2})-(X_{aa3})-(X_{aa4})-(X_{aa5})-(X_{aa6})-(X_{aa7})$  (SEQ ID NO:183), donde  $(X_{aa2})$  es un residuo aminoacídico no catiónico,  $(X_{aa3})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa4})$  es cualquier residuo aminoacídico,  $(X_{aa5})$  se selecciona del grupo que consiste en D-Arg, L-Arg, D-Lys y L-Lys,  $(X_{aa6})$  es un residuo no catiónico, y  $(X_{aa7})$  es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol se selecciona del grupo que consiste en D-Cys, L-Cys, un péptido que contiene D-Cys, y un péptido que contiene L-Cys. Cuando el grupo de conjugación que contiene tiol es un aminoácido o un péptido, puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol es un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:183. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales (es decir, el conjugado es un dímero).

En algunas realizaciones, las enseñanzas incluyen un conjugado de un grupo de conjugación que contiene tiol y un

péptido que comprende la secuencia aminoacídica (D-Cys)-(D-Ala)-(X<sub>aa3</sub>)-(X<sub>aa4</sub>)-(D-Arg)-(D-Ala)-(X<sub>aa7</sub>) (SEQ ID NO:161), donde (X<sub>aa3</sub>) es cualquier residuo aminoacídico, (X<sub>aa4</sub>) es cualquier residuo aminoacídico, y (X<sub>aa7</sub>) es cualquier residuo aminoacídico. El péptido puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el péptido tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol se selecciona del grupo que consiste en D-Cys, L-Cys, un péptido que contiene D-Cys, y un péptido que contiene L-Cys. Cuando el grupo de conjugación que contiene tiol es un aminoácido o un péptido, puede tener una protección N-terminal, una protección C-terminal, o ambas. En una realización preferida, el grupo de conjugación que contiene tiol tiene tanto una protección N-terminal como una protección C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol es un péptido que comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO:161. En algunas realizaciones, el grupo de conjugación que contiene tiol y el péptido son iguales (es decir, el conjugado es un dímero).

### III. Métodos de uso

15 En un aspecto, se contempla un método de uso para prevenir, tratar o mejorar el hiperparatiroidismo, enfermedad ósea y/u otros trastornos hipercalcémicos mediante la administración de los compuestos descritos en el presente documento. Como se ha ilustrado anteriormente, los compuestos tienen actividad para disminuir los niveles de la PTH y/o calcio en un tejido o tejidos diana, o en un sujeto. En ciertas realizaciones, los compuestos descritos son capaces de disminuir los niveles de la PTH y/o calcio cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto a un sujeto que necesita tal tratamiento. El método de uso se describirá ahora haciendo referencia a los Ejemplos 3 y 8-11.

Con referencia de nuevo al Ejemplo 3, y como se ha analizado anteriormente con respecto a la Tabla 1, se administró la serie de compuestos donde un residuo catiónico (arginina) se reemplazó secuencialmente con un residuo no catiónico (alanina) a las ratas. La figura 5 muestra el perfil temporal de cada capacidad del compuesto para reducir la PTH en sangre y la duración de acción de los compuestos variables. En la figura 5, los compuestos Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, rombos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:8, cuadrados) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10, símbolos x) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12, círculos) son potentes *in vivo*, como resulta evidente por la disminución en la PTH porcentual del valor inicial pre-dosis a esencialmente cero, y proporcionaron una duración de potencia, donde la concentración en sangre de la PTH permaneció disminuida durante al menos cuatro horas. Los compuestos Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9, triángulos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11, símbolos \*) y Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13, símbolos +) disminuyeron la PTH porcentual del valor inicial durante aproximadamente 2-3 horas, y posteriormente, la concentración en sangre de la PTH comenzó a aumentar. La sustitución del residuo catiónico (arginina) en las posiciones subunitarias 5 o 7 de Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) afectó a la duración de la actividad de reducción de la PTH.

También se evaluó el perfil de reducción de la PTH para una serie de compuestos que contienen dobles sustituciones de aminoácidos. Los compuestos seleccionados expuestos en la Tabla 2, anteriormente, se administraron a ratas normales mediante bolo IV a una dosis de 0,5 mg/kg y se evaluó la reducción en la PTH con relación al nivel en sangre de la PTH de la pre-dosis. Los datos se muestran en las figuras 6A, 6B, donde el compuesto se identifica como se indica a continuación: Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26, rombos de color blanco), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25, cuadrados de color blanco), Ac-caarrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22, triángulos), Ac-crrraarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:17, círculos), Ac-c(C)arrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3, rombos figura 6B), Ac-c(C)rrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28, símbolos x, figura 6B).

Se realizó otro estudio para evaluar adicionalmente la potencia del compuesto Ac-c(C)arrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). El compuesto se administró por vía intravenosa a ratas normales, como se detalla en el Ejemplo 2, a dosis de 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,3 mg/kg, y 0,1 mg/kg. Los niveles de la PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación y durante 4 horas después de esto. La figura 7 muestra los resultados, donde la concentración en sangre de la PTH se muestra como porcentaje del valor de pre-dosis de valor inicial. Se observó una reducción de la PTH relacionada con la dosis después de una única administración en bolo IV con la mayor dosis de 1 mg/kg (rombos) que tuvo la mayor reducción en la PTH, seguida de 0,5 mg/kg (cuadrados), 0,3 mg/kg (triángulos), y 0,1 mg/kg (símbolos x). El control con solución salina se muestra por los símbolos de círculos. Como se observa, el péptido cuando se administra a una dosis terapéuticamente eficaz alcanza una reducción en la PTH de más del 50 % con relación a la concentración de la PTH antes de la dosificación ("valor inicial"). Específicamente, el péptido al administrarse a dosis mayores de 0,1 mg/kg redujo la concentración de la PTH a menos del 90 % de la concentración de la PTH a valor inicial 1 hora después de la administración IV. Estas dosis del péptido identificado como la SEQ ID NO:3 también consiguieron un área bajo la curva (AUC) de menos del 50 %, el AUC calculada como la suma de los valores de concentración de la PTH en los puntos de tiempo 1, 2, 3 y 4 horas, normalizado por el AUC para el control con solución salina en los

mismos puntos de tiempo, multiplicado por 100.

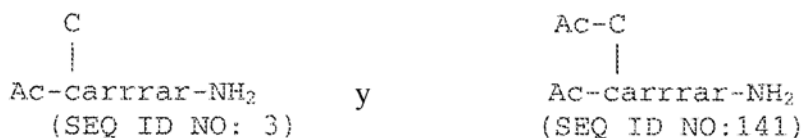
También se ensayó el mismo compuesto en sujetos (ratas) con insuficiencia renal. En este estudio, el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda se utilizó para evaluar el compuesto Ac-c(C)arrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) con el fin de caracterizar su actividad de reducción de la PTH en un entorno de disfunción renal. El modelo se describe en el Ejemplo 1A. El compuesto se administró por vía intravenosa como un bolo a animales comprometidos renalmente (ratas) a dosis de 3 mg/kg (n = 2), 1 mg/kg (n = 5), 0,5 mg/kg (n = 6) y 0,3 mg/kg (n = 5). Un grupo control de animales se dosificó con solución salina. Los niveles de la PTH en plasma se evaluaron antes de la dosificación y varias horas después de esto. La figura 8 muestra los resultados, donde los animales tratados con solución salina (cuadrados) tuvieron una concentración aumentada de la PTH con relación al nivel de la PTH de partida. A diversas dosis de la SEQ ID NO:3, se observó un efecto dependiente de la dosis sobre la duración y grado de reducción de la PTH. Los animales tratados con la menor dosis de 0,3 mg/kg (símbolos x) que exhibieron una PTH reducida en el primer punto de tiempo y un aumento en la PTH entre las horas 1-24 después de la dosificación. Los niveles de dosis de 3 mg/kg (rombos), 1 mg/kg (triángulos) y 0,5 mg/kg (cuadrados) proporcionaron una concentración reducida en sangre de la PTH durante más de 15 horas, y para la dosis mayor, durante más de 24 horas.

En otro estudio para evaluar el efecto de las subunidades catiónicas de sustitución con subunidades no cargadas, como se ilustra mediante los residuos de aminoácidos de alanina, en el contexto de un sujeto con insuficiencia renal, se generó y se ensayó un análogo de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) para determinar su capacidad para disminuir la PTH en animales modelo 1K1C después de una administración intravenosa individual de 1 mg/kg. En el análogo ensayado Ac-carrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26), las subunidades catiónicas en las posiciones X<sub>2</sub> y X<sub>6</sub> de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se sustituyeron con aminoácidos no cargados.

Como se muestra en la figura 9, Ac-carrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26, cuadrados de color blanco) muestra una actividad que es equivalente a Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6, rombos de color blanco) en la dosis ensayada (1 mg/kg) con una duración de acción extendida similar durante 24 horas. Se descubrió que el análogo de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) con las sustituciones subunitarias no cargadas conservaba la actividad y puede, de hecho, tener una potencia *in vivo* y duración de acción superior a la del compuesto identificado como la SEQ ID NO:6. En el compuesto, Ac-carrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26), los residuos D-Arg en las posiciones X<sub>2</sub> y X<sub>6</sub> se sustituyeron con residuos D-ala con relación al compuesto identificado como la SEQ ID NO:6.

De manera significativa, como se ha analizado anteriormente, la administración del compuesto Ac-carrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) no se acompañó de la liberación de histamina, un efecto secundario no deseado que se observa con Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y otros compuestos similares al administrarse a dosis mayores (> 1 mg/kg) mediante bolo IV. La atenuación marcada de la liberación de histamina con el compuesto identificado como la SEQ ID NO:26 aumenta el margen terapéutico entre la actividad para deseada para disminución de la PTH y la actividad no deseada para inducir histamina después de la administración mediante bolo IV. Por consiguiente, en una realización preferida, se proporcionan compuestos que tienen actividad para reducir la concentración de la PTH *in vivo* en ausencia de una respuesta histamínica. Por consiguiente, en una realización, se proporciona un compuesto que tiene actividad para disminuir la PTH donde el compuesto, al administrarse a un sujeto, humano o de otra manera, disminuye el nivel de la PTH a menos del 50 % del nivel de pre-dosis en un término de una hora después de la dosificación. En una realización específica, un compuesto que tiene una actividad significativa para disminuir la PTH se refiere a un compuesto que cuando se administra a una rata normal disminuye el nivel de la PTH a menos del 50 % del nivel de pre-dosis en un término de una hora después de la dosificación mediante bolo IV.

En otro estudio, detallado en el Ejemplo 8, se proporcionan compuestos en la forma de un conjugado, donde la subunidad que contiene tiol en la posición X<sub>1</sub> se unió a través de un enlace disulfuro a un residuo de L-Cys. Estos compuestos tienen las siguientes estructuras:



50

En la notación utilizada en el presente documento, el compuesto que se une al resto que contiene tiol en la

- subunidad X<sub>1</sub> se identifica entre paréntesis, donde en estos conjugados ilustrativos el compuesto L-Cys que se indica (C) se enlaza al resto que contiene tiol en la subunidad X<sub>1</sub>: Ac-c(C)arrnar-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:3) y Ac-c(Ac-C)arrnar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:141). Estos compuestos se administraron a través de un bolo IV a animales con insuficiencia renal aguda (modelo 1K1C) a dosis de 0,3 y 0,5 mg/kg, y los resultados se muestran en la figura 10. El
- 5 compuesto Ac-c(C)arrnar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se representa mediante cuadrados (0,3 mg/kg, n = 5) y símbolos \* (0,5 mg/kg, n = 6) y el compuesto Ac-c(Ac-C)arrnar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:141) mediante triángulos (0,3 mg/kg, n = 8) y rombos (0,5 mg/kg, n = 7). Esta respuesta a la dosis *in vivo* con la SEQ ID NO:3 muestra una reducción dependiente de la dosis en la PTH muy similar a Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6).
- 10 En algunos de los estudios *in vivo* descritos en el presente documento, los compuestos, incluyendo los compuestos en la forma conjugada donde el tiol en la subunidad X<sub>1</sub> se reticula a través de un enlace disulfuro en otra subunidad, se administraron como una infusión IV de 30 minutos. Sin embargo, se debe apreciar que infusiones más cortas (por ejemplo, <5 minutos) o la administración mediante bolo IV típicamente producen una reducción farmacodinámica comparable de la PTH como una infusión de 30 minutos más larga. La administración en bolo subcutáneo también
- 15 demostró ser una ruta de administración eficaz que generó una caída inicial más pequeña en la PTH, pero mostró una reducción sostenida en la PTH similar al perfil observado por la vía IV. Como se muestra en la figura 11, el compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), también se administró por administración transdérmica facilitada por microporos (por ejemplo, microporación del estrato córneo), y demostró una reducción de la PTH en plasma durante las varias horas que se supervisó. El compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), también se administró mediante la
- 20 vía transdérmica después de la microporación, dando como resultado una reducción de la PTH en plasma durante varias horas. La administración transdérmica de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) proporciona una opción de adición para la administración clínica de los compuestos descritos.

- Para evaluar el efecto de la vía de administración sobre la actividad de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) en el contexto
- 25 de un sujeto con insuficiencia renal, se administró a las ratas en el modelo 1K1C 1 mg/kg del péptido como una bolo subcutáneo (SC), o una infusión IV de 30 minutos. Ambas rutas de administración redujeron eficazmente los niveles de la PTH en plasma durante más de 24 horas. Cuando se administró Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) por infusión IV, los niveles de la PTH cayeron rápidamente en un 80-90 % del valor inicial. A las 16 horas después de la dosificación, los niveles de la PTH habían comenzado a aumentar aunque todavía se redujeron en un ~80 % del valor inicial.
- 30 Cuando Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se administró mediante bolo SC, los niveles de la PTH exhibieron una caída inicial más moderada a ~40 % del valor inicial, aunque exhibieron una duración similar de reducción como cuando se suministró el péptido mediante la vía IV. Veinticuatro horas después de la dosificación, los niveles de la PTH en los animales dosificados por cualquier ruta habían rebotado parcialmente, aunque ambos exhibieron niveles reducidos de la PTH que fueron ~40-60 % a partir del valor inicial. Los resultados mostraron que esta ruta de administración
- 35 proporciona un perfil similar con respecto a la eficacia y duración de la reducción de la PTH como la administración IV, proporcionando así una trayectoria alternativa para la dosificación clínica (datos no mostrados).

- Por consiguiente, en una realización preferida, un sujeto que tiene hiperparatiroidismo secundario (SHPT) se trata utilizando los compuestos descritos para reducir los niveles de la PTH en plasma y/o calcio. Los pacientes con SHPT
- 40 sin tratar con hiperparatiroidismo moderadamente severo con frecuencia tienen niveles de la PTH intactos en circulación de valor inicial > 300 pg/ml, y niveles que pueden exceder los 600 pg/ml. En una realización preferida, la disminución en los niveles de la PTH se mide como una disminución en la PTH intacta por debajo de los niveles iniciales de pre-tratamiento. En otra realización, la disminución deseada en la PTH es llevar los niveles de la PTH en plasma a las directrices generalmente reconocidas establecidas por la National Kidney Foundation u otros expertos
- 45 en el tratamiento de trastornos renales e insuficiencia renal.

- En otro aspecto, se proporciona un método de uso para tratar el hiperparatiroidismo, la hipercalcemia y/o enfermedad ósea, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito. En otra realización, el sujeto se puede tratar con un compuesto descrito en combinación con uno o más de otros
- 50 agentes terapéuticamente eficaces.

- En otro aspecto, el compuesto descrito se administra en una cantidad eficaz para reducir la PTH o el efecto de la PTH. En algunas realizaciones, la reducción de la PTH en plasma es de al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 % o 30 % por debajo de los
- 55 niveles iniciales de pre-tratamiento durante al menos 10 horas después de la administración del compuesto descrito. En realizaciones específicas, la reducción de la PTH en plasma es de al menos el 20 % 10 horas después de la administración. En realizaciones preferidas, la reducción de la PTH en plasma es del 15 al 40 %, preferiblemente del 20 al 50 %, más preferiblemente del 30 al 70 % por debajo de los niveles iniciales de pre-tratamiento durante al menos 48 horas después de la administración del compuesto descrito.

- En otro aspecto, el compuesto descrito se administra en una cantidad eficaz para disminuir el calcio sérico o el efecto del calcio. En algunas realizaciones, la reducción en el calcio sérico es de al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % o 25 % por debajo de los niveles de pre-tratamiento durante al menos 10 horas después de la administración del péptido policatiónico. En algunas realizaciones preferidas, la reducción en el calcio sérico es de al menos el 5 % a las 10 horas después de la administración. En algunas realizaciones preferidas, la reducción en el calcio sérico es del 5 al 10 %, preferiblemente del 5 al 20 % por debajo de los niveles de pre-tratamiento durante al menos 48 horas después de la administración del compuesto descrito.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un método de uso para tratar el hiperparatiroidismo y/o la hipercalcemia en un sujeto que necesita el mismo, que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito, donde se reduce la PTH y/o el calcio.
- 15 En base a la relación entre el calcio sérico, el metabolismo óseo y la PTH, se cree que los compuestos descritos son beneficiosos para el tratamiento de diversas formas de enfermedad ósea y/o hipercalcemia además del hiperparatiroidismo. Los compuestos descritos pueden tener ventajas en comparación con los agentes terapéuticos actuales, debido a que se pueden administrar por vía parenteral y pueden no estar asociados a efectos adversos gastrointestinales, no se metabolizan por el citocromo P450 y pueden dar como resultado reducciones más eficaces en la PTH y calcio en plasma.
- 20

Como se ha analizado anteriormente, los métodos descritos se pueden utilizar solos o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticamente eficaces. Dichos otros agentes terapéuticamente eficaces incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con agentes de bifosfonato antirresortivos, tales como, alendronato y risedronato; 25 bloqueadores de integrina, tales como antagonistas  $\alpha_v\beta_3$ , estrógenos conjugados utilizados en la terapia de reemplazo hormonal, tales como PREMPRO™, PREMARIN™ y ENDOMETRION™; moduladores del receptor selectivo de estrógenos (SERM), tales como raloxifeno, droloxifeno, CP-336.156 (Pfizer) y lasofoxifeno; inhibidores de catepsina K, terapia con vitamina D, análogos de vitamina D, tales como ZEMPLAR™ (paricalcitol); CALCIJEX® (calcitriol), HECTOROL® (doxercalciferol), ONE-ALPHA® (alfacalcidol) y los análogos en el desarrollo de 30 Cytochroma conocidos como CTA-018, CTAP201 y CTAP101; otros calcimiméticos tales como Sensipar® (cinacalcet), inhibidores de la familia de transportadores de fosfato sodio-dependiente de tipo II, SLC34 (incluyendo las dos isoformas renales NaPi-IIa y NaPi-IIc, y el transportador NaPi-IIb intestinal); fosfatoinas (incluyendo FGF-23, sFRP4, MEPE o FGF-7); tratamiento con PTH a dosis baja (con o sin estrógeno); calcitonina, inhibidores del ligando RANK, anticuerpos contra el ligando RANK, osteoprotegrina; antagonistas de adenosina; e inhibidores de bomba 35 protónica de ATP.

En una realización, se administra un compuesto descrito a una dosis suficiente para disminuir los niveles tanto de la PTH con del calcio en suero. En otra realización, un compuesto descrito se administra a una dosis suficiente para disminuir la PTH sin afectar significativamente a los niveles de calcio en suero. En una realización adicional, se 40 administra un compuesto descrito a una dosis suficiente para aumentar la PTH sin afectar significativamente los niveles de calcio en suero.

#### Formulaciones

45 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los métodos para preparar estas composiciones farmacéuticas típicamente comprenden la etapa de asociar un compuesto descrito con un vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes secundarios. Los compuestos descritos y/o las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos se 50 pueden formular en forma de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente un compuesto descrito con vehículos líquidos, o vehículos sólidos divididos finamente, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden 55 uno o más compuestos descritos en combinación con uno o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de utilizarse, que pueden contener azúcares, alcoholes, aminoácidos, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.



Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener adyuvantes tales como conservadores, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de los microorganismos con los compuestos descritos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes para controlar la tonicidad, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede obtener mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es conveniente disminuir la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tenga deficiente solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado por vía parenteral se lleva a cabo al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso.

Por ejemplo, un compuesto descrito se puede suministrar a un ser humano en una forma de solución que se produce al reconstituir una forma sólida del fármaco con líquido. Esta solución se puede diluir adicionalmente con un fluido de infusión tal como agua para inyección, inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, inyección de dextrosa al 5 % e inyección de Ringer tratada con lactato. Se prefiere que las soluciones reconstituidas y diluidas se utilicen en 4-6 horas para el suministro de una potencia máxima. Como alternativa, un compuesto descrito se puede administrar a un ser humano en forma de comprimido o cápsula.

Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices microencapsuladas de los compuestos descritos en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción del fármaco con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Las formas de depósito inyectables de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.

Cuando los compuestos descritos se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, los mismos se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, del 0,1 al 99 % (más preferiblemente del 10 al 30 %) del principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede contener 0,2-25 %, preferiblemente 0,5-5 % o 0,5-2 %, del principio activo. Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, por ejemplo, inyección subcutánea, depósito subcutáneo, inyección intravenosa, infusión intravenosa o subcutánea. Estos compuestos se pueden administrar rápidamente (en <1 minuto) como un bolo o más lentamente durante un período de tiempo prolongado (más de varios minutos, horas o días). Estos compuestos se pueden administrar a diario o a lo largo de de múltiples días, continua o intermitentemente. En una realización, los compuestos se pueden administrar por vía transdérmica (por ejemplo, utilizando un parche, microagujas, microporos, pomadas, microchorro o nanochorro).

Sin importar la vía de administración seleccionada, los compuestos descritos, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin que sea tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto descrito particular empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de

administración, la velocidad de excreción o metabolismo del compuesto particular que se empleará, la velocidad y grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico anterior del paciente que se trata, y factores similares ya conocidos en las técnicas médicas.

5

Un médico o veterinario con experiencia en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario puede comenzar con dosis de los compuestos descritos empleados en la composición farmacéutica a niveles menores de los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se alcance el efecto deseado.

10

En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto descrito será aquella cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz en general dependerá de los factores que se han descrito anteriormente. En general, las dosis intravenosas, intramusculares, transdérmicas, intracerebroventricular y subcutáneas de los compuestos descritos para un paciente, cuando se utilicen para los efectos indicados, variarán de entre aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal por hora. En otras realizaciones, la dosis variará entre aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 2,5 mg por kilogramo de peso corporal por hora. En realizaciones adicionales, la dosis variará entre aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal por hora.

15

20 Si se desea, la dosis diaria eficaz de un compuesto descrito se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos adecuados a todo lo largo del día, opcionalmente, en formas unitarias de dosificación. En una realización, el compuesto descrito se administra como una sola dosis al día. En realizaciones adicionales, el compuesto se administra continuamente, tal como a través de la vía intravenosa u otras. En otras realizaciones, el compuesto se administra con menos frecuencia de la diaria, tal como cada 2-3 días, junto con tratamiento de diálisis, semanalmente o con menor frecuencia.

25

El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, incluyendo primates, en particular seres humanos y otros mamíferos tales como equinos, ganado vacuno, cerdos y ovejas; y aves de corral y mascotas en general.

30

Los compuestos descritos se pueden administrar tal cual o en mezclas con vehículos farmacéuticamente aceptables, y también se pueden administrar junto con agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y glicopéptidos. Por lo tanto, la terapia conjuntiva incluye la administración secuencial, simultánea y por separado del compuesto activo de tal forma que los efectos terapéuticos de la primera administrada no desaparezcan por completo cuando se administre la posterior.

35

#### Rutas de administración para los compuestos desvelados

Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada. Como se usa en el presente documento, el término "ruta" de administración pretende incluir, pero sin limitación, inyección subcutánea, depósito subcutáneo, inyección intravenosa, infusión intravenosa o subcutánea, inyección intraocular, inyección intradérmica, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, administración intratraqueal, administración intraadiposal, administración intraarticular, administración intratecal, administración epidural, inhalación, administración intranasal, administración sublingual, administración bucal, administración rectal, administración vaginal, administración intracisternal y administración tópica, administración transdérmica, o administración a través de administración local (por ejemplo, mediante catéter o endoprótesis).

45

La administración transdérmica del fármaco al cuerpo es un método deseable y conveniente para la administración sistémica de las sustancias biológicamente activas a un sujeto, y, en particular para la administración de sustancias que tengan una biodisponibilidad oral deficiente, tales como proteínas y péptidos. La ruta de administración transdérmica ha sido particularmente exitosa con pequeños compuestos lipófilos (por ejemplo, de menos de aproximadamente 1.000 daltons) tales como, escopolamina y nicotina, que pueden penetrar la capa externa del estrato córneo de la piel, que sirve como una barrera eficaz para la entrada de sustancias en el cuerpo. Debajo del estrato córneo se encuentra la epidermis viable, que no contiene vasos sanguíneos, pero tiene algunos nervios. Todavía más profundo se encuentra la dermis, que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Los fármacos que cruzan la barrera del estrato córneo se pueden difundir en general a los capilares en la dermis para su absorción y distribución sistémica.

55

Los avances tecnológicos en la administración transdérmica se han enfocado en abordar la necesidad en la técnica

de administrar compuestos de alto peso molecular, hidrófilos, tales como proteínas y péptidos, a través de la piel. Un enfoque implica la alteración del estrato córneo utilizando métodos químicos o físicos para reducir la barrera planteada por el estrato córneo. La tecnología de microporación cutánea, que implica la creación de trayectorias de transporte de dimensión micrónica (microporos) en la piel (en particular, los microporos en el estrato córneo),  
 5 utilizando una técnica mínimamente invasiva, es un enfoque más reciente. Las técnicas para crear microporos en la piel (estrato córneo) incluyen microporación térmica o ablación, matrices de microagujas, fonoforesis, ablación por láser y ablación por radiofrecuencia (Prausnitz y Langer (2008) Nat. Biotechnology 11: 1261-68; Arora y col., Int. J. Pharmaceutics, 364: 227 (2008); Nanda y col., Current Drug Delivery, 3: 233 (2006); Meidan y col. American J. Therapeutic. 11: 312 (2004)).

10

Como se ha apreciado anteriormente, la secreción de la PTH se regula mediante el CaSR que se expresa sobre la superficie celular de las células paratiroides. Por lo tanto, con el fin de activar el CaSR, el agente o compuesto debe administrarse a las células paratiroides. La administración transdérmica de agentes calcimiméticos debe conseguir la administración a través del estrato córneo y proporcionar una exposición sistémica hasta llegar a la célula  
 15 paratiroidea. Hasta la fecha, la técnica no ha demostrado si un compuesto calcimimético se puede administrar o no por vía transdérmica en una cantidad suficiente para beneficio terapéutico y, en particular en una cantidad suficiente para disminuir la PTH y/o el tratamiento, atenuación, disminución y/o alivio de la hipercalcemia.

Además de los calcimiméticos, los análogos de vitamina D<sub>3</sub> 1,25-(OH)<sub>2</sub> son los tratamientos utilizados más comúnmente para pacientes con hiperparatiroidismo asociada a enfermedad renal crónica y enfermedad renal en  
 20 etapa terminal. Los análogos de vitamina D actúan facilitando la absorción intestinal del calcio dietético, y reducen los niveles de la PTH inhibiendo la síntesis y secreción de la PTH. Aunque se ha utilizado terapéuticamente la administración intravenosa y oral de vitamina D, hasta la fecha, la técnica no ha demostrado si los análogos de vitamina D, tales como ZEMPLAR™ (paricalcitol), CALCIJEX® (calcitriol), ONE-ALPHA® (alfacalcidol) y  
 25 HECTOROL® (doxercalciferol) se pueden administrar o no por vía transdérmica en una cantidad suficiente para un beneficio terapéutico y, en particular en una cantidad suficiente para disminuir la hormona paratiroidea (PTH). Además, la técnica no ha demostrado si la co-administración mediante administración transdérmica de un agente calcimimético en combinación con un análogo de vitamina D (ya sea como formulaciones por separado o como una co-formulación) en cantidades suficientes para beneficio terapéutico, y en particular en cantidades suficientes para  
 30 disminuir la PTH proporcionan un tratamiento eficaz para pacientes que padecen de hiperparatiroidismo.

Los agentes calcimiméticos se pueden administrar a través del estrato córneo, y/u otras capas de la epidermis, para administración local o sistémica, para disminuir la hormona paratiroidea (PTH) y/o tratar la hipercalcemia. En una  
 35 realización, el agente calcimimético se administra a través de microporación. Se contempla una cualquiera de varias técnicas para microporación, y se describen varias brevemente.

La microporación se puede alcanzar por medios mecánicos y/o fuerzas de impulsión externa, para romper el estrato córneo para suministrar los agentes calcimiméticos descritos en el presente documento a través de la superficie de  
 40 la piel y en las capas cutáneas subyacentes y/o el torrente sanguíneo.

En una primera realización, la técnica microporación es la ablación del estrato córneo en una región específica de la piel utilizando una luz láser pulsada de longitud de onda, longitud de pulsos, energía de pulsos, número de pulsos, y  
 45 velocidad de repetición de pulsos suficiente para separar el estrato córneo sin dañar significativamente la epidermis subyacente. El agente calcimimético se aplica entonces a la región de ablación. Otra técnica de microporación por ablación láser, denominada como ondas de estrés inducido por láser (LISW), implica ondas unipolares y compresibles, de banda ancha, generadas por láseres con pulsos de alta potencia. Las LISW interactúan con los tejidos para descomponer los lípidos en el estrato córneo, creando canales intercelulares transitorios dentro del estrato córneo. Estos canales, o microporos, en el estrato córneo permiten la entrada del agente calcimimético.

50 La sonoforesis o fonoforesis es otra técnica de microporación que utiliza energía de ultrasonido. El ultrasonido es una onda sónica que posee frecuencias superiores a 20 KHz. El ultrasonido se puede aplicar continuamente o por pulsos, y se aplica a diversas variaciones de frecuencia e intensidad (Nanda y col., Current Drug Delivery, 3: 233 (2006)).

55 Otra técnica de microporación implica el uso de una matriz de microagujas. La matriz de microagujas, al aplicarse a la región cutánea en un sujeto perfora el estrato córneo y no penetran a una profundidad que estimule significativamente los nervios ni perfora los capilares. Por lo tanto, el paciente siente ninguna o una mínima incomodidad o dolor tras la aplicación de la matriz de microagujas para la generación de microporos a través de los cuales se administra el agente calcimimético.

Se contemplan las matrices de microagujas que constan de microagujas huecas o sólidas, donde el agente se puede recubrir la superficie externa de las agujas o suministrarse desde el interior de las agujas huecas. Se describen ejemplos de matrices de microagujas, por ejemplo, en Nanda y col., *Current Drug Delivery*, 3: 233 (2006) y Meidan y col. *American J. Therapeutic*, 11: 312 (2004). Las matrices de microagujas de primera generación constaban de microagujas de silicio, sólidas, que se recubrían externamente con un agente terapéutico. Cuando la micromatriz de agujas se presionaba contra la piel y se retiraba después de aproximadamente 10 segundos, la permeación del agente sobre las agujas en el cuerpo se conseguía fácilmente. Las matrices de microagujas de segunda generación constaban de microagujas de silicio sólido o hueco, policarbonato, titanio u otro polímero adecuado, y se recubrían o rellenaban con una solución del compuesto terapéutico. Las generaciones más recientes de matrices de microagujas se preparan a partir de polímeros biodegradables, donde las puntas de las agujas se recubren con un agente terapéutico que permanece en el estrato córneo y se disuelven lentamente.

Las microagujas se pueden construir a partir de una diversidad de materiales, incluyendo metales, cerámicas, semiconductores, orgánicos, polímeros, y compuestos. Los materiales de construcción ilustrativos incluyen acero inoxidable de grado farmacéutico, oro, titanio, níquel, hierro, estaño, cromo, cobre, paladio, platino, aleaciones de estos u otros metales, silicio, dióxido de silicio, y polímeros. Los polímeros biodegradables representativos incluyen, polímeros de hidroxácidos tales como, ácido láctico y poliláctido de ácido glicólico, poliglicólido, poliláctido-co-glicólido, y copolímeros con poli(etilenglicol), polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), y poli (láctido-co-caprolactona). Los polímeros no biodegradables representativos incluyen policarbonato, poliéster, y poliacrilamidas.

Las microagujas pueden tener puntas rectas o afiladas. En una realización, el diámetro de la microaguja es mayor en el extremo de la base de la microaguja y se afila hasta una punta en el extremo distal de la base. La microaguja también se puede fabricar para que tenga una punta que incluya tanto una porción recta (no ahusada) como una porción afilada. Las agujas pueden no tener tampoco un extremo afilado en absoluto, es decir, pueden ser simplemente cilindros con puntas romas o planas. Una microaguja hueca que tiene un diámetro prácticamente uniforme, pero que no está afilada con respecto a un punto, se denomina en el presente documento como un "microtubo". Como se usa en el presente documento, el término "microaguja" incluye tanto microtubos como agujas afiladas, a menos que se indique otra cosa.

La electroporación es otra técnica para crear microporos en la piel. Este enfoque utiliza la aplicación de pulsos eléctricos largos de alta tensión de microsegundos o milisegundos para crear poros transitorios, permeables dentro del estrato córneo.

Otras técnicas de microporación incluyen el uso de ondas de radio para crear microcanales en la piel. La ablación térmica es otro enfoque más para conseguir la administración de compuestos de mayor peso molecular por vía transdérmica.

Los solicitantes han descubierto que se pueden administrar terapéuticamente bajas dosis de agentes calcimiméticos durante un período prolongado de tiempo para tratar la SHPT. Esto difiere notablemente de los requisitos actuales de dosis de otros calcimiméticos (por ejemplo, clorhidrato de cinacalcet).

La administración transdérmica de los compuestos descritos en el presente documento se demostró en los estudios descritos en los Ejemplos 9-10. En un primer estudio, el compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se administró por vía transdérmica a ratas en las que se realizaron microporos en una pequeña zona de la piel mediante 5 pases de un rodillo dérmico de 1,0 mm a presión moderada. Una solución de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) o solución salina se puso sobre el área de la piel con microporo. Se extrajo sangre durante un periodo de 4 horas y se analizó el plasma para los niveles de la PTH mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 11, donde se muestra la PTH en plasma como un porcentaje del valor inicial pre-dosis para el animal tratado con solución salina (rombos) y los dos animales tratados con el compuesto de ensayo (cuadrados, triángulos). Estos datos indican que el compuesto Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) se puede suministrar sistémicamente en cantidades suficientes por vía transdérmica (en este caso, administración transdérmica facilitada por microporos) utilizando un rodillo dérmico para reducir eficaz y significativamente los niveles de la PTH del valor inicial durante ~4 horas que duraron los estudios. Se debe observar que Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) ha mostrado reducir eficazmente los niveles de la PTH del valor inicial en el modelo de rata 1K1C de insuficiencia renal aguda al administrarse mediante infusión corta IV, así como en ratas normales (datos no mostrados).

En otro estudio, descrito en el Ejemplo 10, el compuesto Ac-c(C)arrarr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se administró por vía

transdérmica facilitada por microporos a ratas normales utilizando un parche transdérmico. Se puso un sistema de parches transdérmicos que contenían solución al 10 % (en peso) de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) en solución salina sobre el área con microporos y se dejó en el lugar durante ~30 horas. Se realizaron extracciones de sangre de las ratas periódicamente durante las 30 horas y se analizaron las muestras de plasma para determinar los niveles de PTH mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 12. Sorprendentemente, estos datos demuestran que la administración transdérmica facilitada por microporos puede conseguir una administración sostenida suficiente de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) para producir una reducción significativa y extendida en la PTH durante >30 horas en ratas con función renal normal. Estos datos demuestran que la administración transdérmica facilitada por microporación del conjugado Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) utilizando un parche puede conseguir suficiente exposición en la sangre del péptido durante el curso de tratamiento para producir una reducción significativa y sostenida en la PTH a partir del valor inicial durante >30 horas. Estos datos demuestran que la administración por parche transdérmico en una base diaria o mayor podría permitir el tratamiento de pacientes tanto con diálisis como sin hemodiálisis que necesitan el tratamiento. Por ejemplo, CKD (fase 4), el hiperparatiroidismo primario y el hiperparatiroidismo secundario (SHPT) en pacientes con trasplante renales que no se trataron típicamente con fármacos IV, pero que se podrían tratar fácilmente mediante un parche transdérmico diariamente a través de microporación facilitó la administración transdérmica.

Se realizó otro estudio para evaluar adicionalmente la vía de administración de los compuestos. Como se describe en el Ejemplo 11, el compuesto Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se administró mediante infusión IV a dosis muy baja a ratas normales y a ratas con insuficiencia renal para identificar la menor dosis necesaria a administrar por infusión, sistema de parches transdérmicos u otros medios de administración sostenida para conseguir una reducción significativa de la PTH. Ratas sanas se infundieron por vía intravenosa durante seis horas con dosis muy bajas (1 µg/kg/h, 3 µg/kg/h, y 10 µg/kg/h) de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). Se extrajeron muestras sanguíneas antes de la dosificación (pre) y a las 2 horas, 4 horas, 6 horas (justo antes de terminar la infusión; EOI) y 8 horas (2 horas después de la EOI) después del inicio de la infusión y se analizó el plasma para determinar los niveles de la PTH mediante ELISA. Sorprendentemente, los datos mostrados en la figura 13 demuestran que la infusión de dosis muy bajas de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) (1 µg/kg/h (cuadrados), 3 µg/kg/h (círculos), y 10 µg/kg/h (triángulos)) durante 6 horas son eficaces para producir una reducción significativa en la PTH a partir del valor inicial a través del transcurso de la infusión. Estos datos indican que dosis bajas administradas continuamente podrían ser tan eficaces como (o incluso más eficaces que) la administración de dosis mucho mayores en forma de un bolo individual.

El efecto de disminución de la PTH se evaluó adicionalmente en el modelo de rata 1K1C de insuficiencia renal aguda. A las ratas del modelo 1K1C se les administró por infusión intravenosa dosis bajas de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) (30 µg/kg/h y 100 µg/kg/h) durante 6 horas. Se extrajeron muestras sanguíneas antes de la dosificación (Pre), y a las 2 horas, 4 horas, 6 horas (justo antes del término de la infusión; EOI), 8 horas (2 horas antes de la EOI) y 24 horas después del inicio de la infusión y se analizó el plasma para determinar los niveles de la PTH mediante ELISA. Los datos mostrados en la figura 14A demuestran que la infusión IV de dosis bajas de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) reducen significativamente la PTH de los niveles del valor inicial en el modelo 1K1C, un modelo de insuficiencia renal donde se pueden observar niveles de la PTH de valor inicial que van de 400 a >1100 pg/ml. Sorprendentemente, 6 horas de una infusión IV de dosis baja (rombos, 30 µg/kg/h y cuadrados, 100 µg/kg/h) de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) fueron capaces de reducir la PTH inicial durante ~24 horas. Consistente con esta drástica reducción de la PTH en el modelo de rata 1K1C, la figura 14B muestra una gráfica de barras que representa los datos de calcio sérico en esta insuficiencia renal aguda, y muestra una reducción correspondiente en el calcio sérico después de una infusión IV de dosis baja de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). Estos datos demuestran que Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) es un compuesto calcimimético muy potente que es capaz de reducir la PTH y el calcio después de la infusión o administración de dosis bajas (por ejemplo, mediante suministro transdérmico) durante el curso de ~24 horas. Estos datos apoyan adicionalmente la conclusión de que la administración sostenida de dosis bajas de un agente calcimimético mediante infusión IV o mediante administración transdérmica facilitada por microporos puede ser un tratamiento eficaz para pacientes en una base diaria o menos frecuente.

#### Terapia de combinación

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de uso se pueden utilizar en solitario o en combinación con otros enfoques para el tratamiento de la hipercalcemia y/o la enfermedad ósea. Estos otros procedimientos incluyen, pero sin limitación, tratamiento con agentes tales como agentes de bisfosfonato, bloqueantes de integrina, terapia de reemplazo hormonal, moduladores del receptor selectivo de estrógenos, inhibidores de la catepsina K, terapia con vitamina D, análogos de vitamina D, tales como ZEMPLAR™ (paricalcitol), CALCIJEX® (calcitriol), ONE-ALPHA®

(alfacalcidol) y HECTOROL® (doxercalciferol), agentes antiinflamatorios, terapia de la PTH a dosis baja (con o sin estrógenos), calcimiméticos, aglutinantes de fosfato, calcitonina, inhibidores del ligando RANK, anticuerpos contra el ligando RANK, osteoprotegrina, antagonistas de adenosina e inhibidores de bomba protónica con ATP.

5 En una realización, una terapia de combinación utiliza vitamina D o un análogo de vitamina D en combinación con un agente calcimimético. La vitamina D facilita la absorción del calcio y funciona para mantener los niveles sanguíneos normales de calcio y fosforoso. La PTH funciona para mejorar la absorción de calcio en el intestino aumentando la producción de vitamina D 1,25-(OH)<sub>2</sub>, la forma activa de la vitamina D. La PTH también estimula la excreción de fósforo del riñón, y aumenta la liberación del hueso.

10

Como se ha analizado anteriormente, el hiperparatiroidismo secundario se caracteriza por una elevación en la hormona paratiroidea (PTH) asociada a niveles inadecuados de la hormona con vitamina D activa. Puede usarse vitamina D o un análogo de vitamina D para reducir los niveles elevados de la PTH en el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario. En una realización, la invención incluye una composición farmacéutica que

15

En una realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un agente calcimimético y ZEMPLAR™ (paricalcitol). Paricalcitol es un análogo sintético de calcitriol, la forma metabólicamente activa de la vitamina D. La dosis inicial recomendada de Zemplar se basa en los niveles iniciales de la hormona paratiroidea

20

intacta (iPTH). Si el nivel inicial de la iPTH es menor o igual a 500 pg/ml, la dosis diaria es 1 µg y la dosis "tres veces a la semana" (que se administrará con un día de por medio) es 2 µg. Si la iPTH inicial es mayor de 500 pg/ml, la dosis diaria es 2 µg, y la dosis "tres veces a la semana" (que se administrará con un día de por medio) es 4 µg. Después de esto, la dosificación se debe individualizar y basarse en los niveles de la iPTH en plasma sérico, con la supervisión del calcio sérico y el fósforo sérico. Paricalcitol se describe en la Patente de Estados Unidos n.º

25

5.246.925 y la Patente de Estados Unidos n.º 5.587.497.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un agente calcimimético y CALCIJEX® (calcitriol). El calcitriol es la forma metabólicamente activa de la vitamina D. La dosificación inicial recomendada para CALCIJEX® (oral) es 0,25 µg/día. Esta cantidad se puede aumentar en 0,25 µg/día a intervalos de

30

4 a 8 semanas. Los niveles normales o sólo ligeramente reducidos de calcio pueden responder a dosificaciones de 0,25 µg cada dos días. Para pacientes con diálisis, la dosis inicial recomendada para CALCIJEX® (IV) es 0,02 µg/kg (1 a 2 µg) 3 veces/semana, cada dos días. Esta cantidad se puede aumentar en 0,5 a 1 µg, cada 2 a 4 semanas. Calcitriol se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 6.051.567 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.265.392, y la Patente de Estados Unidos n.º 6.274.169.

35

En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente calcimimético y HECTOROL® (doxercalciferol). Doxercalciferol es un análogo sintético de la vitamina D que experimenta activación metabólica *in vivo* para formar 1α,25-dihidroxitamina D<sub>2</sub>, una forma biológicamente activa de la vitamina D de origen natural. La dosis inicial recomendada de HECTOROL® es 10 µg administrada tres veces a la semana en

40

diálisis (aproximadamente cada dos días). La dosis inicial se debe ajustar, según se requiera, para disminuir la iPTH en sangre en el intervalo de 150 a 300 pg/ml. La dosis se puede aumentar a intervalos de 8 semanas en 2,5 µg si la iPTH no disminuye en un 50 % y no puede alcanzar el intervalo diana. La dosis máxima recomendada de HECTOROL es 20 µg administrada tres veces a la semana en diálisis para un total de 60 µg a la semana. Doxercalciferol se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.602.116 y la Patente de Estados Unidos n.º

45

5.861.386 y la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.473 y la Patente de Estados Unidos n.º 6.903.083.

La combinación particular de terapias (productos terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación deberá tomar en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o los procedimientos

50

deseados y el efecto terapéutico deseado a conseguir. También se debe apreciar que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención se puede administrar concurrentemente con otro agente utilizado para tratar el mismo trastorno), o se pueden conseguir diferentes efectos (por ejemplo, el control de cualesquiera efectos adversos). Como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales, que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad, o afección, particular se conocen como "adecuados para la enfermedad, o afección, que se trata".

55

Un tratamiento de combinación de la presente invención como se define en el presente documento se puede conseguir por medio de la administración simultánea, secuencial o por separado de los componentes individuales de dicho tratamiento.

- Los compuestos o las composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos también se pueden incorporar en composiciones para recubrir dispositivos médicos implantables, polímeros bio-erosionables, bombas implantables, y supositorios. Por consiguiente, en otro aspecto de la divulgación, se contempla una composición para recubrir un dispositivo implantable que comprende un compuesto descrito como se ha descrito en general anteriormente, y un vehículo adecuado para recubrir el dispositivo implantable. Aún en otro aspecto de la divulgación, se incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende un compuesto como se ha descrito en general anteriormente, y un vehículo adecuado para recubrir dicho dispositivo implantable.
- 10 Los recubrimientos adecuados y la preparación general de los dispositivos implantables recubiertos se describen en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los recubrimientos son materiales poliméricos típicamente biocompatibles tales como polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, acetato etilvinílico, y mezclas de los mismos. Los recubrimientos opcionalmente se pueden recubrir adicionalmente mediante un revestimiento adecuado de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para impartir características de liberación controlada en la composición.

Marcadores clínicos potenciales para determinar la eficacia del tratamiento

- 20 La determinación de la eficacia de un método de tratamiento descrito se puede determinar mediante una diversidad de métodos.

Los niveles normales de calcio sérico están en el intervalo de 8,8 mg/dl a 10,4 mg/dl (2,2 mmol/l a 2,6 mmol/l). En ciertos casos, la eficacia del tratamiento se puede determinar mediante la medición de los marcadores séricos y urinarios relacionados con el calcio, incluyendo, pero sin limitación, calcio sérico total y ionizado, albúmina, PTH en plasma, PTHrP, fosfato, vitamina D y magnesio.

- En otros casos, la eficacia se puede determinar mediante la medición de la densidad mineral ósea (DMO), o mediante la medición de marcadores bioquímicos para la formación de hueso y/o resorción ósea en suero u orina.
- 30 Los marcadores potenciales de formación ósea incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, osteocalcina sub-carboxilada, propéptido de procolágeno tipo I C-terminal, y propéptido de procolágeno tipo I N-terminal. Los marcadores potenciales de resorción ósea incluyen, pero sin limitación, hidroxiprolina, hidroxilisina, hidroxilisina de glicosil-galactosilo, hidroxilisina de galactosilo, piridinolina, desoxipiridinolina, telopéptido reticulante N-terminal del colágeno tipo I, telopéptido reticulante C-terminal del colágeno tipo I, telopéptido reticulante C-terminal del colágeno tipo I, generado mediante por MMP, sialoproteína ósea, fosfatasa de ácido y fosfatasa de ácido resistente a tartrato.

En otros casos, la eficacia se puede determinar mediante la reducción porcentual en la PTH con relación a un nivel de pre-dosificación (valor inicial) y/o consiguiendo un nivel deseable de la PTH como se acepta en general como beneficioso para los pacientes (por ejemplo, las directrices establecidas por la National Kidney Foundation). Todavía en otros casos, la eficacia se puede determinar mediante la medición de la reducción en la hiperplasia de la glándula paratiroides asociada a una enfermedad de hiperparatiroidismo.

- Se espera que cuando se administre un método de tratamiento descrito a un sujeto que necesite el mismo, el método de tratamiento producirá un efecto, según se mide mediante, por ejemplo, uno o más de: calcio sérico total, calcio sérico ionizado, calcio total en sangre, calcio ionizado en sangre, albúmina, PTH en plasma, PTH en sangre, PTHrP, fosfato, vitamina D, magnesio, densidad mineral ósea (DMO), fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, osteocalcina sub-carboxilada, propéptido de procolágeno tipo I C-terminal, propéptido de procolágeno tipo I N-terminal, hidroxiprolina, hidroxilisina, hidroxilisina glicosil-galactosilo, hidroxilisina galactosilo, piridinolina, desoxipiridinolina, telopéptido reticulante N-terminal de colágeno tipo I, telopéptido reticulante C-terminal de colágeno tipo I generado por MMP, sialoproteína ósea, fosfatasa de ácido y fosfatasa de ácido resistente a tartrato. Los efectos incluyen el tratamiento profiláctico, así como el tratamiento de una enfermedad existente.

Una molécula biológicamente eficaz se puede enlazar funcionalmente a un péptido descrito con un enlace covalente o una interacción no covalente. En realizaciones específicas, las moléculas biológicamente eficaces enlazadas funcionalmente pueden alterar la farmacocinética de los compuestos descritos en virtud de conferir propiedades al compuesto como parte de una molécula enlazada. Algunas de las propiedades que las moléculas biológicamente eficaces pueden conferir a los compuestos descritos incluyen, pero sin limitación: administración de un compuesto a una ubicación discreta dentro del cuerpo; concentración de la actividad de un compuesto en una ubicación deseada

en el cuerpo y reducción de sus efectos en otro sitio; reducir los efectos secundarios del tratamiento con un compuesto; cambiar la permeabilidad de un compuesto; cambiar la biodisponibilidad o la velocidad de administración al cuerpo de un compuesto; cambiar la duración del efecto del tratamiento con un compuesto; alterar la estabilidad química *in vitro* del compuesto; alterar la estabilidad *in vivo* del compuesto, semivida, depuración, absorción, 5 distribución y/o excreción; alterar la velocidad de la aparición y la disminución de los efectos de un compuesto; proporcionar una acción permisiva al permitir que un compuesto tenga un efecto.

En un aspecto adicional, el compuesto descrito se puede conjugar con polietilenglicol (PEG). El PEG seleccionado puede ser de cualquier peso molecular conveniente, y puede ser lineal o ramificado, y se puede conjugar 10 opcionalmente a través de un enlazador. El peso molecular medio del PEG variará preferiblemente entre aproximadamente 2 kiloDalton (kDa) a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 40 kDa. Como alternativa, el resto PEG usado puede ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 kDa.

15 Los compuestos descritos se pueden conjugar con PEG a través de un residuo de aminoácido adecuado ubicado en cualquier posición en los compuestos. Los compuestos descritos opcionalmente pueden contener un residuo de aminoácido adicional con el que se conjuga el PEG, incluyendo por ejemplo, un residuo adicional que contiene amina, tal como lisina.

20 Se conoce en la técnica que los péptidos PEGilados aumentan la semivida en suero del péptido conjugado. Se conocen en la técnica una diversidad de métodos para la formación de los péptidos PEGilados. Por ejemplo, el resto PEG se puede enlazar al extremo amino, el extremo carboxi o a través de una cadena lateral del péptido reivindicado, opcionalmente a través de la presencia de un grupo de unión. En otras realizaciones, el resto PEG se puede enlazar al azufre de un aminoácido que contiene tiol, tal como cisteína, o se puede acoplar a la cadena lateral 25 de un aminoácido que contiene amina, tal como lisina.

Los grupos PEG en general se unirán al compuesto descrito mediante acilación o alquilación a través de un grupo reactivo en el resto PEG (por ejemplo, un aldehído, amina, oxima, hidrazina tiol, éster, o un grupo de ácido 30 carboxílico), a un grupo reactivo en el compuesto descrito (por ejemplo, un aldehído, amina, oxima, hidrazina, éster, ácido o grupo tiol), que se pueden ubicar en el extremo amino, el extremo carboxi, o una posición de cadena lateral del compuesto descrito. Un enfoque para la preparación de la PEGilación de péptidos sintéticos consiste en combinar a través de un enlace conjugado en solución, un péptido y un resto PEG, teniendo cada uno un grupo funcional que es reactivo el uno hacia el otro. Los péptidos se pueden preparar fácilmente utilizando una solución convencional o técnicas de síntesis en fase sólida. La conjugación del péptido y el PEG típicamente se realiza en fase acuosa y se puede supervisar mediante HPLC en fase inversa. Los péptidos PEGilados se pueden purificar y 35 caracterizar fácilmente, utilizando técnicas estándar conocidas por un experto en la técnica.

Una o más subunidades individuales de los compuestos descritos también se pueden modificar con diversos agentes derivatizantes conocidos por reaccionar con cadenas laterales específicas o residuos terminales. Por 40 ejemplo, los residuos de lisinilo y los residuos de amino terminales se pueden hacer reaccionar con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico similares que invierten la carga del residuo lisinilo o amino. Otros reactivos adecuados incluyen, por ejemplo, imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; piridoxal; fosfato de piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencensulfónico; O-metilisourea; 2,4,-pentandiona; y reacción catalizada con transaminasa con glioxalato. Los residuos de arginilo se pueden modificar mediante una reacción con agentes 45 convencionales, tales como fenilglioxal, 2,3-butandiona, 1,2-ciclohexandiona, y ninhidrina.

Además, los compuestos descritos se pueden modificar para que incluyan residuos no catiónicos que proporcionen residuos inmunógenos útiles para el desarrollo de anticuerpos para mediciones ELISA bioanalíticas, así como para 50 evaluar la inmunogenicidad. Por ejemplo, los compuestos descritos se pueden modificar mediante la incorporación de residuos de tirosina y/o glicina. Las modificaciones específicas de residuos de tirosilo son de particular interés para introducir etiquetas espectrales en los residuos de tirosilo. Los ejemplos no limitantes incluyen la reacción con compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar derivados de O-acetiltirosilo y 3-nitro, respectivamente.

55 Kits que comprenden los compuestos desvelados

La divulgación también proporciona kits para realizar los regímenes terapéuticos de la divulgación. Dichos kits comprenden cantidades eficaces de los compuestos descritos que tienen actividad como un modulador de CaSR, en forma farmacéuticamente aceptable, en solitario o en combinación con otros agentes, en forma farmacéuticamente



aceptable. Las formas farmacéuticas preferidas incluyen los compuestos descritos en combinación con una solución salina estéril, solución de dextrosa, solución tamponada, agua estéril, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la composición puede incluir un agente antimicrobiano o bacteriostático. Como alternativa, la composición se puede liofilizar o desecar. En este caso, el kit puede comprender además una solución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente estéril, para formar una solución con fines de inyección. En otra realización de la divulgación, el kit puede comprender además una aguja o jeringa, preferiblemente envasada de forma estéril, para inyectar la composición. En otras realizaciones de la divulgación, el kit puede comprender además un medio de instrucciones para administrar la composición a un sujeto. El medio de instrucciones puede ser una inserción escrita, una cinta de audio, una cinta audiovisual, o cualquier otro medio para dar instrucciones sobre la administración de la composición a un sujeto.

En una realización de la divulgación, el kit comprende (i) un primer recipiente que contiene un compuesto descrito que tiene actividad como un modulador de CaSR; y (ii) medios de instrucciones para su uso. En otra realización de la divulgación, el kit comprende (i) un primer recipiente que contiene un compuesto como se describe en el presente documento, y (ii) un segundo recipiente que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable para dilución o reconstitución.

En otra realización de la divulgación, el kit comprende (i) un primer recipiente que contiene un compuesto descrito que tiene actividad como un modulador del CaSR; (ii) un segundo recipiente que contiene un agente anticalcémico; y (iii) los medios de instrucciones para su uso.

En una realización, el agente anticalcémico es un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes de bisfosfonato, agentes terapéuticos para reemplazo hormonal, terapia con vitamina D, análogos de vitamina D, tales como ZEMPLAR™ (paricalcitol); CALCIJEX® (calcitriol), ONE-ALPHA® (alfacalcidol) y HECTOROL® (doxercalciferol), PTH a baja dosis (con o sin estrógeno), y calcitonina.

En aspectos relacionados de la divulgación, la divulgación proporciona los artículos de fabricación que comprenden el contenido de los kits que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende una cantidad eficaz de un péptido descrito, en solitario o en combinación con otros agentes, y los medios de instrucciones que indican el uso para el tratamiento de las enfermedades descritas en el presente documento.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, los compuestos y métodos descritos en el presente documento. Se pueden realizar diversas modificaciones por el experto sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la materia descrita en el presente documento.

### Ejemplo 1

#### Compuestos catiónicos con actividad para disminuir la PTH

##### Modelo de insuficiencia renal

Un modelo de rata de insuficiencia renal aguda (también denominado como el modelo 1K1C) se desarrolló para simular la patología del SHPT asociado a una enfermedad renal en etapa terminal. El modelo tiene características patológicas del hiperparatiroidismo asociado a una falta de función renal, en especial la elevación significativa de la PTH en plasma y la reducción en el calcio sérico. El desarrollo de este modelo permitió la caracterización adicional de los compuestos descritos en el contexto de un sujeto con disfunción renal y la PTH elevada. Los niveles de la PTH de valor inicial típicos en este modelo eran una media de ~450 pg/ml.

El modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda implicó la eliminación de un riñón seguido de la exposición del riñón restante a 45 minutos de isquemia y 48 horas de reperfusión. El consiguiente daño por isquemia/reperfusión (I/R) al riñón restante dio como resultado una necrosis significativa e insuficiencia renal. Los niveles de creatinina en suero se elevaron durante más de 24-48 horas después del ataque por I/R (datos no mostrados). También debido a la disociación renal resultante, los niveles totales de la PTH se aumentaron drásticamente a partir de los niveles de lesión por pre-I/R de ~100 pg/ml. 48 horas posteriores a I/R, los niveles de la PTH en plasma se elevaron a ~450 pg/ml (aumento de ~5 veces) y en algunos casos fueron tan altos como ~1200 pg/ml. Este aumento reproducible en la creatinina y la PTH en suero proporcionó un modelo robusto que imita la fisiología observada en pacientes con

## ESRD.

Se ensayó clorhidrato de cinacalcet (SENSIPAR®), un agente calcimimético aprobado que se utiliza para disminuir la PTH para el tratamiento del SHPT, en el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda. La administración oral de cinacalcet a 30 mg/kg disminuyó significativamente la PTH en aproximadamente el 50 % hasta 6 horas. Este resultado es consistente con los datos preclínicos publicados para cinacalcet (Nemeth y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 308(2): 627-35 (2004)) y valida que el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda es un modelo adecuado para evaluar la actividad de los calcimiméticos para esta indicación.

10 El protocolo utilizado en este estudio es como se indica a continuación. Se adquirieron ratas macho Sprague Dawley en Charles River Laboratories (Hollister, CA; peso de adquisición solicitado 250-275 g). Para estudios con artículos de ensayo, los animales se canularon previamente en las venas femoral y yugular para la administración del fármaco y extracciones de sangre, respectivamente. Los animales se mantuvieron en un entorno con temperatura controlada con un ciclo constante de 12 horas de luz/12 de horas oscuridad y con acceso libre a alimento y agua en todo momento. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con las directrices de IACUC.

Se indujo anestesia general y se mantuvo mediante inyección intraperitoneal (IP) de pentobarbital sódico (5,2 %, 0,4 ml/rata). Para los animales que recibieron 45 minutos de isquemia renal, se administró una inyección IP adicional de pentobarbital sódico (5,2 %, 0,1 ml/rata) para mantener el plano anestésico. El muestreo sanguíneo para las mediciones de la PTH después de la administración de los compuestos en ratas normales se realizó bajo anestesia continua de isoflurano.

Para todo el procedimiento se utilizó una técnica limpia, aséptica. Después de que se anestesiaron las ratas, se rasuró el abdomen con maquinilla eléctrica antes de la operación y la piel se limpió con una solución de alcohol al 70 %.

Para los estudios de desarrollo del modelo, la vena femoral izquierda se canuló con un tubo PE-10 para la extracción de sangre. Ambos riñones se expusieron a través de una laparotomía. Se realizó una nefrectomía derecha después de que se ligaron el pedículo renal derecho y la uretra con suturas dobles de seda 2-0. Después de la confirmación de la falta de hemorragia en el pedículo derecho, se seccionó cuidadosamente la arteria renal izquierda y se sujetó con un microclip vascular para inducir isquemia global renal izquierda. La isquemia renal se confirmó mediante la observación de un cambio de color global blanco-gris (blanqueo). La incisión abdominal se cubrió temporalmente con gasa para ayudar a mantener la temperatura de los órganos abdominales. Después de 45 minutos, el período designado de la isquemia, el clip se retiró y el flujo de la arteria renal izquierda se consideró restaurado tras la observación de una restauración global de color rojo. La incisión abdominal se cerró en capas con suturas de seda 2-0. Después, el animal se recuperó de la anestesia. Los parámetros fisiológicos incluyendo la temperatura corporal (36-37,5 °C) y el peso corporal se midieron a todo lo largo del procedimiento. La temperatura corporal se controló y se mantuvo utilizando un sistema de retroalimentación con sonda rectal y almohadillas con calor.

Aproximadamente 48 horas después de la cirugía 1K1C (lesión por I/R), los animales se dosificaron con diversos compuestos para medir los efectos de la PTH y el calcio en plasma. En la mayoría de los casos, los artículos de ensayo se administraron mediante infusión IV (tiempo de infusión 5, 10 o 30 minutos) aunque en algunos estudios los compuestos se administraron mediante bolo IV o inyección de bolo subcutáneo (SC). Para la administración del fármaco y las extracciones de sangre, los animales se anestesiaron con isoflurano.

Se recolectaron periódicamente muestras sanguíneas a todo lo largo del curso del estudio. Las muestras séricas se analizaron para los niveles de calcio y las muestras del plasma se analizaron para la PTH. Debido a la variación de los valores de la PTH de valor inicial para ratas individuales, todos los datos se normalizaron a los niveles de pre-dosificación (valor inicial). La creatinina sérica se midió utilizando un kit disponible comercialmente de BioAssay Systems (Hayward, Ca), catálogo #DICT-500. Los análisis se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### B. Compuestos de ensayo en modelo de insuficiencia renal

Se prepararon compuestos con las siguientes secuencias para el ensayo en el modelo de insuficiencia renal: Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4), *n* = 4, Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5), *n* = 4, Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), *n* = 7, Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7), *n* = 4, y control de solución salina, *n* = 2. Los péptidos se administraron a los animales a una dosis de 3 mg/kg mediante una infusión IV de 30 minutos. Antes de la dosificación, se extrajo una muestra de sangre

para determinar el valor inicial, la concentración en plasma de la PTH pre-dosificación. Los resultados se muestran en la figura 1 como se indica a continuación: Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4, rombos), Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5, cuadrados), Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:6, triángulos), y Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7, cuadrados de color blanco).

## 5 Ejemplo 2

### Ensayo celular *in vitro* en HEK-293 que expresa el receptor detector de calcio humano

Se sembraron células 293T de riñón embrionario humano (HEK) en un matraz T25 a 2 millones de células por matraz y se dejaron incubar a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante una noche. El día después, estas células se transfectoron con el receptor CaSR humano utilizando un reactivo de transfección con lipofectamina 2000, 24 horas después de la transfección, las células se sembraron en placas de 384 pocillos a 8.000 células/pocillo. Los ensayos se llevaron a cabo 48 horas después del transfección. En algunos casos, se determinaron los valores de EC<sub>50</sub> al medir la producción de monofosfato de inositol en las células HEK293, transfectadas de forma estable con el receptor detector de calcio humano (véase la Tabla 1).

El medio de cultivo celular se aspiró de los pocillos y se reemplazó con 28 µl de tampón de estimulación 1x (Hepes 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, KCl 4,2 mM, NaCl 146 mM, glucosa 5,5 mM, LiCl 50 mM pH 7,4). Las células se incubaron con los compuestos a diversas concentraciones (1 mM o 300 µM como la mayor y además diluciones en serie 1/2 log) a 37 °C durante 1,5 horas antes de terminar la reacción. La producción de IP<sub>1</sub> se determinó en las células utilizando el kit Cisbio IP-One (621 PAPEC) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, la incubación con el compuesto se terminó al añadir secuencialmente IP<sub>1</sub> marcado con D2 y anti-IP<sub>1</sub> marcado con criptato en tampón de lisis y al incubar adicionalmente a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas se leyeron a 620 nm y 668 nm con excitación de 314 nm. Como control negativo se utilizaron 293 células no transfectadas.

Se determinó la proporción de fluorescencia a 668 nm y 620 nm. Se calcularon las concentraciones de IP<sub>1</sub> a partir de curvas estándar (generadas con Graph Pad Prism ver. 4) utilizando concentraciones conocidas de los estándares IP<sub>1</sub>. Se calcularon los EC<sub>50</sub> en base a los valores de la proporción fluorescente OD(668 nm)/(OD620 nm) utilizando un ajuste de curva de regresión no lineal adecuada en el software Prism.

Los péptidos y conjugados se prepararon mediante química en fase sólida a una escala de 0,25 mmol en un sintetizador automático ABI. El acoplamiento secuencial de los Fmoc-aminoácidos (4 equiv., Anaspec) para la resina Rink-amida (NovaBiochem) se realizó utilizando activación HBTU/DIEA. El péptido ensamblado se escindió con un cóctel de TFA (fenol (5 %), trisopropilsilano (2,5 %) y agua (2,5 %); 10 ml por gramo de resina) y se aisló mediante precipitación con dietiléter. Después de la purificación mediante HPLC C<sub>18</sub>, el producto final se aisló en la forma de sal de TFA mediante la liofilización de fracciones adecuadas, y se caracterizó mediante HPLC (pureza >95 %) y LC-MS (PM confirmado).

## 40 Ejemplo 3

### Administración *in vivo* de los compuestos con subunidades catiónicas

Los péptidos se administraron por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg en ratas normales Sprague Dawley anestesiadas con isoflurano. Un grupo control de ratas se trató con una solución salina. Se extrajo sangre antes de la dosificación y cada hora durante 4 horas. Las ratas se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano durante todo el estudio. La concentración de la PTH en plasma se midió mediante ELISA, detectando la PTH 1-84 intacta bioactiva (número de catálogo 60-2700 Immotopics International), y el área bajo la curva acumulativa para la AUC se calculó para los puntos de datos inclusivos de 1-4 horas. La reducción porcentual de la PTH se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:  $AUC_{\text{comp. tratado}}/AUC_{\text{control de solución salina}} * 100$ .

## Ejemplo 4

### Estudios de la relación estructura-actividad: Actividad *in vivo*

Los péptidos probados identificados en el presente documento como la SEQ ID NO:26 (Ac-carrar-NH<sub>2</sub>) y como la SEQ ID NO:29 (Ac-arrar-NH<sub>2</sub>) se ensayaron *in vitro* utilizando las células transfectadas HEK293 CaSR, de acuerdo con el procedimiento en el Ejemplo 2. Los péptidos también se ensayaron *in vivo*, mediante administración como un bolo IV a ratas normales Sprague Dawley a dosis de 9 mg/kg para la SEQ ID NO:29 y a 0,5 mg/kg para la SEQ ID

NO:26. Como un control se utilizó un bolo intravenoso (IV) de solución salina. Los niveles de la PTH en plasma ( $K_2$ EDTA) se valoraron antes de la dosificación y 1, 2, 3 y 4 horas después de la dosificación. Las ratas se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano durante todo el estudio. Los resultados se muestran en las figuras 2A-2B, se presentan como promedio de grupo  $\pm$  desviación estándar (DE). En la figura 2B, la PTH se muestra como el 5 porcentaje del valor pre-dosis del valor inicial.

### Ejemplo 5

#### Estudios de la relación estructura-actividad: Subunidades de D y L-aminoácidos

10

Se preparó una serie de compuestos que tenían un residuo de L-aminoácido sustituido por un residuo de D-aminoácido. Los compuestos se administraron como un bolo IV a ratas normales Sprague Dawley a una dosis de 0,5 mg/kg. Como un control se utilizó un bolo intravenoso (IV) de solución salina. Los niveles de la PTH en plasma ( $K_2$ EDTA) se valoraron antes de la dosificación al, 1,2, 3 y 4 horas después de la dosificación, y se calculó la AUC 15 como se ha descrito anteriormente. Las ratas se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano durante todo el estudio. Los resultados se muestran en la Tabla 4 anterior.

### Ejemplo 6

#### 20 Estudios de la relación estructura-actividad: Liberación de histamina

Para evaluar la carga neta positiva sobre la liberación de histamina asociada a un compuesto, se generaron péptidos que contenían de 4 a 7 residuos catiónicos (arginina) y se ensayaron para determinar su capacidad para provocar la liberación de histamina *in vivo*. Los péptidos probados incluyeron (i) Ac-crrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:4), (ii) Ac-crrrrr-NH<sub>2</sub> 25 (SEQ ID NO:5), (iii) Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) y (iv) Ac-crrrrrrr-NH<sub>2</sub>; SEQ ID NO:41).

Se obtuvieron ratas macho Sprague-Dawley (Charles River) pre-canuladas en las venas femoral y yugular para la infusión del fármaco y extracciones de sangre, respectivamente. Todos los tratamientos con el fármaco IV se realizaron bajo anestesia (isoflurano). Los animales se dosificaron mediante un empuje IV de 1 minuto en un volumen total de 0,5 ml. Se extrajeron muestras de sangre 5, 15 y 30 minutos después del bolo IV para generar 30 muestras en plasma ( $K_2$ EDTA) para análisis de histamina. Durante los 30 minutos de los estudios de infusión IV, se extrajo una muestra al término de la infusión. En algunos casos, se utilizaron ratas en el modelo 1K1C de isquemia renal aguda.

35 Se inyectó un volumen igual de solución salina después de cada extracción de sangre para reemplazar el volumen perdido. Se extrajeron aproximadamente 0,2 ml de sangre en cada punto de tiempo utilizando jeringas pre-recubiertas con EDTA para facilitar la recolección de suero.

40 Los ELISA para histamina se realizaron en plasma diluido utilizando el kit para inmunoensayo de la enzima de histamina (EIA) (Cat #A05890, SPI-BIO, Montigny le Bretonneux, Francia). El kit de EIA de histamina es un inmunoensayo de enzimas competitivo amplificado por derivación que detecta la histamina en una variación de 40 pg/ml hasta 5.500 pg/ml. Las muestras se analizaron por duplicado de acuerdo con el protocolo del fabricante.

45 Los péptidos liofilizados (sales de TFA) se pesaron y la masa registrada se ajustó para el contenido de péptido. Las soluciones se prepararon al disolver el material en solución salina normal para generar la concentración deseada de péptidos. En algunos casos, la molaridad del péptido se ajustó para permitir una comparación entre péptidos. Los péptidos se administraron mediante bolo IV a una dosis equivalente sobre una base por mol como la SEQ ID NO:41 (es decir, 0,7  $\mu$ mol/rata) mediante un bolo IV de 1 minuto y se midió la histamina en plasma antes de la dosificación (pre-dosis), 5, 15 y 30 minutos después de la dosificación. Los datos se presentan como promedios de grupo (n = 2) 50  $\pm$  DE. La liberación de histamina se muestra como un cambio de veces de los niveles de pre-dosis (valor inicial). Los resultados se muestran en el figura 3. Los datos se presentan como promedios de grupo (n = 2)  $\pm$  DE.

### Ejemplo 7

#### 55 Estudios de la relación estructura-actividad: Liberación de histamina

Para la evaluación *in vitro* de la liberación de histamina, se aislaron mastocitos perifoneales de ratas aisladas realizando un lavado peritoneal utilizando HBSS frío + HEPES 25 mm pH 7,4 que contenía heparina (5 u/ml). Las

células se lavaron dos veces en tampón de estimulación (HBSS + HEPES 25 mM pH 7,4) y se incubaron con 10 µM del compuesto en tampón de estimulación (HBSS + HEPES 25 mM pH 7,4) durante 15 minutos en una placa de 96 pocillos (10<sup>6</sup>/pocillo) a 37 °C. El sobrenadante celular se analizó para determinar la histamina utilizando el kit de EIA (Cayman #589651). Los datos se muestran en la Tabla 10.

5

Para la evaluación *in vivo* de la liberación de histamina, los compuestos se dosificaron en ratas normales anestesiadas con isoflurano a 2 mg/kg mediante bolo IV (administrado durante menos de un minuto). La histamina en plasma se midió 5 minutos después de la administración del compuesto (Cayman para histamina EIA #589651). Los datos se muestran en la Tabla 11.

10

Las abreviaturas utilizadas en el presente documento, y en particular en las Tablas 10-11, se resumen aquí.

Ahx	ácido 6-aminohexanoico
Aib	ácido 2-aminoisobutírico
bAla	beta-alanina (ácido 3-aminopropiónico)
dHcy	D-homocisteína
dNle	D-norleucina
dNva	D-norvalina
dPen	D-penicilamina
EG	separador de etilenglicol, H2N-(CH2CH2-O)4-CH2-CO2H
Hcy	homocisteína
Mpa	ácido 3-mercaptopropiónico o ácido mercaptopropiónico
Nma	N-metilalanina
PEG	poli(etilenglicol)
Sar	Sarcosina (N-metilglicina)
dHar	D-homoarginina
GS	Glutación (conjugado)
DAP	ácido 1,3-diaminopropiónico

### Ejemplo 8

15

Estudios de la relación estructura-actividad: Actividad *in vivo*

En el compuesto Ac-c(C)arrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se preparó para comparación con el compuesto Ac-carrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26). En el compuesto Ac-c(C)arrrrar-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:3) la subunidad que contiene tiol en la posición X<sub>1</sub> se conjugó a través de un enlace disulfuro a un residuo L-Cys. Los dos compuestos se administraron a través del bolo IV a animales con el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda a dosis de 0,3 y 0,5 mg/kg. Los niveles en plasma de la PTH se evaluaron antes de la dosificación y periódicamente durante 24 horas después de la dosificación. Los resultados se muestran en la figura 10, donde los datos mostrados son los promedios de grupo ± SEM donde en función del tiempo, en ratas con el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda, el compuesto Ac-c(C)arrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) se representa por cuadrados (0,3 mg/kg, n = 5) y los símbolos \* (0,5 mg/kg, n = 6) y el compuesto Ac-c(Ac-C)arrrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:141) por triángulos (0,3 mg/kg, n = 8) y rombos (0,5 mg/kg, n = 7).

25

### Ejemplo 9

30

Suministro transdérmico facilitado por microporos de agentes calcimiméticos

Para evaluar la administración sistémica de un agente calcimimético, se administró por vía transdérmica Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) a ratas CD sin pelo utilizando un depósito. Se aplicó Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) como una solución al 10 % en solución salina a una zona de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> sobre la espalda de las ratas sin pelo CD<sup>®</sup> a las que se les practicó microporación con 5 pasos de un rodillo dérmico de 1,0 mm a presión moderada. Se pegó una cámara de poliestireno (D.I. 9,5 mm) sobre la zona de la piel con microporos para crear un depósito para fármacos en el que se aplicaron Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) o una solución salina. Se administró una solución al 10 % de Ac-crrrrrr-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6) en la cámara del depósito en dos ratas, se administró una solución salina en solitario en la cámara del depósito en una rata. Los depósitos se cubrieron con cinta para evitar la evaporación. Se realizaron extracciones de sangre durante un periodo de 4 horas y el plasma se analizó para los niveles de la PTH mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 11.

35

40

**Ejemplo 10**Administración sostenida de agentes calcimiméticos mediante parche transdérmico facilitado por microporo

5 Para evaluar adicionalmente la administración sistémica de un agente calcimimético, se administró por vía transdérmica Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) a ratas normales utilizando un parche transdérmico. Ratas normales se trataron con una disposición de microaguja y un sistema de parches transdérmicos. Un área pequeña de pelo en la espalda de ratas Sprague Dawley (~350 g) se rasuró utilizando maquinillas y en una zona de la piel se practicó  
 10 microporación utilizando una matriz de 14 x 14 (~1 cm<sup>2</sup>) de microagujas (~0,5 mm). Un sistema de parches transdérmicos que contenían una solución al 10 % (en peso) de Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) en solución salina se colocó sobre el área con microporos y se dejó en el lugar durante ~30 horas. Se tomaron extracciones de sangre de las ratas periódicamente durante las 30 horas y se analizaron las muestras de plasma para los niveles de la PTH mediante ELISA. Los resultados se muestran en la figura 12.

15

**Ejemplo 11**Infusión de agentes calcimiméticos

20 Para evaluar adicionalmente el efecto de disminución de la PTH del compuesto calcimimético, se administró Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3) mediante infusión IV a dosis muy bajas a ratas normales y a ratas con insuficiencia renal para identificar la menor dosis necesaria a administrar mediante infusión, sistema de parches transdérmicos u otros medios de administración sostenida para conseguir una reducción significativa de la PTH. A ratas macho normales Sprague-Dawley (250-300 g) se les infundió por vía intravenosa durante 6 horas Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ  
 25 ID NO:3) a velocidades de dosis de 1 µg/kg/h, 3 µg/kg/h y 10 µg/kg/h. Se extrajeron muestras de sangre antes de la dosificación, en 2 horas, 4 horas, 6 horas (justo antes del final de la infusión; EOI) y 8 horas (2 horas después de la EOI) y el plasma se analizó para determinar los niveles de la PTH mediante ELISA. Los datos se muestran en la figura 13, donde las ratas tratadas con 1 µg/kg/h (cuadrados), 3 µg/kg/h (rombos), y 10 µg/kg/h (triángulos) durante 6 horas fueron capaces de producir una reducción significativa en la PTH a partir del valor inicial durante el transcurso  
 30 de la infusión.

Se realizó un estudio similar en ratas con el modelo 1K1C de insuficiencia renal aguda. A las ratas del modelo 1K1C se les infundió por vía intravenosa Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:273) a velocidades de dosis de 30 µg/kg/h y 100 µg/kg/h durante 6 horas. Se extrajeron muestras sanguíneas para dosificación (Pre), en 2 horas, 4 horas, 6 horas  
 35 (justo antes del término de la infusión; EOI), 8 horas (2 horas después de la EOI) y 24 horas y el plasma se analizó para determinar los niveles de la PTH mediante ELISA. Los datos se muestran en la figura 14A (30 µg/kg/h, rombos, y 100 µg/kg/h, cuadrados), y el calcio sérico para los animales se muestra en la figura 14B.

**LISTA DE SECUENCIAS**

40

<110> Karim, Felix  
 Baruch, Amos  
 Maclean, Derek

45 &lt;120&gt; Agentes terapéuticos para reducir los niveles de hormona paratiroidea

&lt;130&gt; 63200.8017.WO00

&lt;140&gt; Aún no asignado

50 &lt;141&gt; Presentado con la presente

&lt;150&gt; US 61/229.695

&lt;151&gt; 2009-07-29

55 &lt;150&gt; US 61/255.816

&lt;151&gt; 2009-10-28

<150> US 61/313.635  
<151> 2010-03-12

<160> 183

5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(7)

<223> Xaa = cualquier aminoácido como se define en la memoria descriptiva presentada con la presente

20

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

25 <210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

35 <223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> VARIANT

<222> (2), (6)

40 <223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

45 <223> Xaa = D-Arg

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- <210> 3
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa = D-Cys
- 15
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Acetilación N-terminal
- 20
- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (1)..(1)
- <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys
- 25
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (2), (6)
- <223> Xaa = D-Ala
- 30
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (3), (4), (5), (7)
- <223> xaa = D-Arg
- 35
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (7)
- <223> Amidación C-terminal
- 40
- <400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- 45 <210> 4
- <211> 5
- <212> PRT



<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

10 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(5)

<223> Xaa = D-Arg

20 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)

<223> Amidación C-terminal

25 <400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 5

30 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

40 <223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

45 <223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(6)

50 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Amidación C-terminal  
 5  
 <400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

10 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD...RES  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40  
 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(8)  
 <223> xaa = D-Arg  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20 <400> 7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 8  
 25 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 35 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 40 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(2)  
 45 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3)..(7)  
 50 <223> xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

5 <400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 9  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 20 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(2)  
 30 <223> xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3)..(3)  
 35 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)..(7)  
 40 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 45 <223> Amidación C-terminal

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

20 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

25 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = D-Ala

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

35  
 <400> 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40 <210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT

50 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)...(4), (6)...(7)  
 10 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5)..(5)  
 15 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 20 <223> Amidación C-terminal

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 35 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (2)...(5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (6)..(6)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 12

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

25 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(6)

<223> Xaa = D-Arg

<221> VARIANT

35 <222> (7)..(7)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

40 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 13

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

45

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (6)

<223> Xaa = D-Arg

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (4), (7)

<223> Xaa = D-Ala

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

30

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

35 <210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

45 <222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

50 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (4)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (5) (6), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 15  
 <400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (2), (5)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (3), (4), (6), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 16

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5 <210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT

15 <222> (1)..(1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES

20 <222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> VARIANT

25 <222> (2), (3), (6), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
<221> VARIANT

30 <222> (4), (5)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
<221> MOD\_RES

35 <222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

40  
  
<210> 18  
<211> 7  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

50 <220>  
<221> VARIANT

<222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 10 <221> VARIANT  
 <222> (2), (4), (6), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 15 <221> VARIANT  
 <222> (3), (5)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 20 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 18  
 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 19  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

35 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

45 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (7)  
 <223> Xaa = D-Ala

50 <220>  
 <221> VARIANT

<222> (3)...(6)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 19  
 10

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 20  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético  
 20

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> xaa = D-Cys

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

30 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (4), (5), (6)  
 <223> Xaa = D-Arg

35 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (7)  
 <223> Xaa = D-Ala

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

45 <400> 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

50 <210> 21  
 <211> 7

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (4), (7)  
 20 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5), (6)  
 25 <223> xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 30 <223> Amidación C-terminal

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

35  
 <210> 22  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> xaa = D-Cys

<220>  
 50 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (2)...(3)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (4)...(7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 22

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

20

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

35 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (3), (6)

<223> Xaa = D-Ala

50 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 23

5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 24

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = D-Cys

20

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

25

<220>

<221> VARIANT

<222> (2), (5), (6), (7)

<223> Xaa = D-Arg

30

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4)

<223> Xaa = D-Ala

35

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

40

<400> 24

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

45 <210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 15 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4), (6)  
 20 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 25 <223> Amidación C-terminal

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

30  
 <210> 26  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 5 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 10 <223> Amidación C-terminal

<400> 26

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15  
 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 35 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> xaa = D-Ala

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> xaa = D-Arg

<220>  
 50 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5

<210> 28  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>

15 <221> VARIANT  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>

20 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>

25 <221> DISULFID  
<222> (1)..(1)  
<223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>

30 <221> VARIANT  
<222> (2), (3), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>

35 <221> VARIANT  
<222> (4), (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>

40 <221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 28

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1), (5)  
 10 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (4), (6)  
 20 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 25 <223> Amidación C-terminal

<400> 29

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

30  
 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = bAla

<220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (2)

<223> xaa = D-Cys

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (3)...(8)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (8)

<223> Amidación C-terminal

<400> no

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Ácido 3-mercaptopropiónico

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(7)

<223> Xaa = D-Arg

35 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

40 <400> 31

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 32

45 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-Homocisteína

5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

10

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

20

<400> 32

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 33  
 <211> aa  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT

35 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = D-penicilamina

<220>  
 <221> MOD\_RES

40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT

45 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES

50 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 33

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5 <210> 34  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT

15 <222> (1)..(1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES

20 <222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> DISULFID

25 <222> (1)..(1)  
<223> Enlace disulfuro intercatenario Cys-Cys

<220>  
<221> VARIANT

30 <222> (2), (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
<221> VARIANT

35 <222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
<221> MOD\_RES

40 <222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 34

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

45

<210> 35  
<211> 7  
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 10 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>  
 15 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 20 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 25 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 35  
 30

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 36  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

40 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

50 <220>

<221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

5 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

20  
 <400> 36

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 37  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

10

<400> 37

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15 <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 25 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (3), (4), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Xaa  
 1 5

5

<210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>

15 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>

20 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>

25 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>

30 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>

35 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>

40 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa  
 1 5

45

<210> 40  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 15 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace disulfuro Cys-Cys a Cys

<220>  
 20 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 40  
 35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg  
 1 5

<210> 41  
 <211> 9  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido sintético

45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
5 <221> VARIANT  
<222> (2)...(9)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
10 <221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 41  
15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 42  
<211> 7  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

25  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

30  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

35  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

40  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

45  
<400> 42

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
1 5

50 <210> 43

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 10 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 20 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 43

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa  
 1 5

30

<210> 44  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

45 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 <223> Xaa = D-Arg

50 <220>  
 <221> VARIANT

<222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>

5 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 44

10

Cys Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg  
 1 5

<210> 45

<211> 9

15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 45

.....  
 Cys His Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Asp  
 1 5

25 <210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 46

Cys Pro Asp Tyr His Asp Ala Gly Ile  
 1 5

35

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
5 <223> Amidación C-terminal  
  
<400> 47

Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

10  
<210> 48  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15  
<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
20 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
25 <221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 48  
30

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 49  
<211> 8  
35 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

40  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

45  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (4), (5)  
 5 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (6), (7), (8)  
 10 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 49

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20  
 <210> 50  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 30 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Tyr

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (3)  
 <223> Xaa = D-Gly

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (4), (7), (8), (10), (11), (12)  
 <223> Xaa = D-Arg



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5), (6)  
 5 <223> Xaa = D-Lys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (9)  
 10 <223> Xaa = D-Gln

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10

20  
 <210> 51  
 <211> aa  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 30 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 51

50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- <210> 52  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Péptido sintético
- 10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys
- 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal
- 20 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala
- 25 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg
- 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal
- 35 <400> 52

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- <210> 53  
 40 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 45 <223> Péptido sintético
- <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 50 <223> Xaa = D-Cys
- <220>

<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

5 <220>  
<221> DISULFID  
<222> (1)..(1)  
<223> Disulfuro Cys-Cys unido a Glutación

10 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)..(7)  
<223> Xaa = D-Arg

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

20 <400> 53

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 54  
25 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
35 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> DISULFID  
<222> (1)..(1)  
40 <223> Disulfuro Cys-Cys unido a Glutación

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)..(7)  
45 <223> Xaa = D-Arg

<400> 54

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

50  
<210> 55

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 10 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 20 <222> (1)..(1)  
 <223> Disulfuro Cys-Cys unido a Glutación acetilado

<220>  
 <221> VARIANT  
 25 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 55

40 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 56  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

50 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> DISULFID

10 <222> (1)..(1)

<223> Disulfuro Cys-Cys unido a ácido 3-mercaptopropiónico

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (2), (6)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

20 <222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

25 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 56

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

45 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

50 <220>

<221> DISULFID

<222> (1)..(1)

<223> Disulfuro Cys-Cys unido a polietilenglicol

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (2), (6)

<223> xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

20

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

35 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

40 <220>

<221> DISULFID

<222> (1)..(1)

<223> Disulfuro Cys-Cys unido a polietilenglicol

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (6)

<223> Xaa = D-Ala

50 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 58

10 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

25 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

30 <220>

<221> DISULFID

<222> (1)..(1)

<223> Disulfuro Cys-Cys unido a polietilenglicol

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(7)

<223> Xaa = D-Arg

40 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

45 <400> 59

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 60

50 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

15

<220>

<221> DISULFID

<222> (1)..(1)

<223> Disulfuro Cys-Cys unido a Cys

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (2), (6)

<223> Xaa = D-Ala

25

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

35

<400> 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40 <210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

50 <222> (1)

<223> Xaa = bala



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 10  
 <220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Disulfuro Cys-Cys unido a Cys  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (7)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4), (5), (6), (8)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 30  
 <400> 61  
  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
  
 35 <210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (1)  
 <223> Xaa = bAla  
  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Disulfuro Cys-Cys unido a Cys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (7)  
 10 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4), (5), (6), (8)  
 15 <223> Xaa = D-Arg  
 <400> 62

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 <400> 63

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5

45  
 <210> 64  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

15 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

20 <400> 64

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa  
1 5

<210> 65  
25 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
35 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
40 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (6)  
45 <223> Xaa = D-val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
50 <223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

5 <400> 65

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 66  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 20 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 30 <223> Xaa = D-val

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 35 <223> Xaa = D-Arg

<400> 66

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40  
 <210> 67  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 50 <221> VARIANT

<222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 5 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 10 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 15 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 67  
 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 68  
 <211> 7  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

30  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

40  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

50  
 <220>

<221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Glu

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

10 <400> 68

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 69  
 15 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 25 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 30 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 35 <223> Xaa = D-Glu

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 40 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 45 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 50 <223> Amidación C-terminal

<400> 69

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5 <210> 70  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT

15 <222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES

20 <222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> VARIANT

25 <222> (2), (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
<221> VARIANT

30 <222> (3), (4), (5)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
<221> VARIANT

35 <222> (7)  
<223> Xaa = D-Lys

<220>  
<221> MOD\_RES

40 <222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 70

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

45

<210> 71  
<211> 7  
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Glu

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

25

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

35

<400> 71

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40 <210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

50 <222> (1)

<223> Xaa = D-Cys



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3)  
 <223> Xaa = D-Lys  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 25  
 <400> 72

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

30 <210> 73  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala



<400> 74

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5

<210> 75  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>

15 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>

20 <221> MOD\_RES  
<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

25 <400> 75

Cys Ala Arg Arg Arg Ala Arg  
1 5

<210> 76

30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT  
<222> (1)  
40 <223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
45 <223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT  
<222> (2), (3)  
50 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)...(9)  
 5 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9)  
 10 <223> Amidación C-terminal

<400> 76

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15  
 <210> 77  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa == D-Cys

<220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 35 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (4)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (5)...(10)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (10)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 77

50

ES 2 607 954 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- <210> 78  
<211> 9  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Péptido sintético
- 10 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys
- 15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal
- 20 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (4), (6), (8)  
<223> xaa = D-Ala
- 25 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (5), (7), (9)  
<223> Xaa = D-Arg
- 30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)  
<223> Amidación C-terminal
- 35 <400> 78

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- 40 <210> 79  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Péptido sintético
- <220>  
<221> VARIANT
- 50 <222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (2), (6), (8)

<223> xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (3), (4), (5), (7), (9)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

20 <222> (9)

<223> Amidación C-terminal

<400> 79

25 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(7)

<223> xaa = D-Arg

45 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

50 <400> 80

ES 2 607 954 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 81  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

10 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

20 <220>  
<221> DISULFID  
<222> (1)..(1)  
<223> Enlace intercatenario Cys-Cys con benzoílo

25 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)..(7)  
<223> Xaa = D-Arg

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

35 <400> 81

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

40 <210> 82  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
50 <222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Enlace intercatenario Cys-Cys con acetilo

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(7)  
 15 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 20 <223> Amidación C-terminal

<400> 82

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25  
 <210> 83  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 35 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)



<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (6)

<223> xaa = D-Phe

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 83

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

15

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> xaa = D-Cys

30 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> xaa = D-Ala

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> xaa = D-Arg

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> xaa = D-Ile

50 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 84

5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 85

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> xaa = D-Cys

20

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

25

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Ala

30

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

35

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Leu

40

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

45

<400> 85

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Val  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 30  
 <400> 87

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

35 <210> 88  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 50 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> xaa = D-Pro  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20  
 <400> 88

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 89  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 5 <223> Xaa = D-His

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 10 <223> Amidación C-terminal

<400> 89

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15  
 <210> 90  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 35 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Gln

<220>  
 50 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 90

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

20 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

25 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Ala

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Thr

40 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

45 <400> 91

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 92

50 <211> 7

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 10 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 20 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 25 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 30 <223> Xaa = D-Ser

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 35 <223> Amidación C-terminal

<400> 92

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

40  
 <210> 93  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (1)



<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (2)

<223> xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

20 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 93

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
1 5

25

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

40 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Gle

50 <220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 94  
 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 95  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético  
 25

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

35 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

40 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

50 <400> 95

ES 2 607 954 T3

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- <210> 96
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (1)
- <223> Xaa = D-Cys
- 15
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Acetilación terminal
- 20
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (2)
- <223> Xaa = D-Ile
- 25
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (3), (4), (5), (7)
- <223> Xaa = D-Arg
- 30
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (6)
- <223> Xaa = D-Ala
- 35
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (7)
- <223> Amidación C-terminal
- 40
- <400> 96

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- 45 <210> 97
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
5 <221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
10 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
15 <221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Xaa = D-Pro

<220>  
20 <221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> xaa = D-Arg

<220>  
25 <221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
30 <221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal,

<400> 97  
35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 98  
<211> 7  
40 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

45  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

50  
<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

5 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Xaa = D-Leu

10 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

15 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

25 <400> 98

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 99  
30 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
40 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
45 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
50 <223> Xaa = D-Gln

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

5

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

15

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20 <210> 100  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (1)  
 <223> xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Thr

<220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

10

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

25 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Val

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

45 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

50 <400> 101

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 102  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

20 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ser

25 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

30 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

40 <400> 102

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

45 <210> 103  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
5 <221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>  
10 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
15 <221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Xaa = D-His

<220>  
20 <221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
25 <221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
30 <221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 103  
35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 104  
<211> 7  
40 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

45 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

50 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

5 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Phe

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> xaa = D-Arg

15 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 104

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 105  
 30 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 40 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 50 <223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

10 <400> 105

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 106  
 15 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 25 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 30 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 35 <223> xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 40 <223> Xaa = D-Pro

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 45 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 50 <223> Amidación C-terminal

<400> 106

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5 <210> 107  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT

15 <222> (1)  
<223> xaa = D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES

20 <222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>  
<221> VARIANT

25 <222> (2), (3), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>  
<221> VARIANT

30 <222> (4)  
<223> Xaa = D-Glu

<220>  
<221> VARIANT

35 <222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
<221> MOD\_RES

40 <222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 107

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

45

<210> 108  
<211> 7  
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> péptido sintético

5 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> xaa = D-Cys

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

15 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (3), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

20 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (4)  
<223> Xaa = D-Thr

25 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

35 <400> 108

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 109  
40 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
50 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 <223> Xaa = D-His  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 25  
 <400> 109

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

30 <210> 110  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 5 <223> Xaa = D-Phe

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 10 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20  
 <210> 111  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 30 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 <223> xaa = D-Ser

<220>  
 50 <221> VARIANT  
 <222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 111

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

10

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

25 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (4)

<223> xaa = D-Gln

40 <220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

45 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

50 <400> 112



# ES 2 607 954 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- <210> 113  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Péptido sintético  
10  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys  
15  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal  
20  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (3), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg  
25  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (4)  
<223> Xaa = D-Val  
30  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala  
35  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal  
40  
<400> 113

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- 45 <210> 114  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
50 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

10 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> VARIANT

20 <222> (4)

<223> Xaa = D-Leu

<220>

<221> VARIANT

25 <222> (6)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

30 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 114

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

35

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> xaa = D-Cys

50 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 10 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 <223> Xaa = D-Ile

<220>  
 15 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 20 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 115  
 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 116  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

35  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

50  
 <220>  
 <221> VARIANT

<222> (4)  
 <223> Xaa = N-metilglicina (sarcosina)

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 116  
 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 117  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

25 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

35 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

40 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

45 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = N-metilglicina (sarcosina)

50 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

5 <400> 117

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 118  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 20 <223> xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 30 <223> Xaa = N-metilalanina (Nma)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 35 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 40 <223> Amidación C-terminal

<400> 118

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

45  
 <210> 119  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

15 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (3), (5), (7)  
<223> xaa = D-Arg

20 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (4)  
<223> Xaa = D-Ala

25 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = N-metilalanina (Nma)

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

35 <400> 119

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 120  
40 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
50 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = ácido 2-aminoisobutírico (Aib)  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20  
 <400> 120

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 121  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 45 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (4)  
 <223> Xaa = M-metilalanina (Nma)





<400> 122

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

5

<210> 123  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>

15 <221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

<220>

20 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

<220>

25 <221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Xaa = ácido 2-aminoisobutírico (Aib)

<220>

30 <221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

<220>

35 <221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>

40 <221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 123

45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 124

<211> 7

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

15

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa = D-Ala

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

25

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = ácido 2-aminoisobutírico (Aib)

30

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

35

<400> 124

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

40 <210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> VARIANT

50 <222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (2), (6)

<223> Xaa = N-metilglicina (sarcosina)

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (3), (4), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

20 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 125

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <220>

<221> VARIANT

Cys

<220>

40 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

45 <221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

50 <221> VARIANT

<222> (4)  
 <223> xaa = D-Ala

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = N-metilglicina (sarcosina)

<220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 126  
 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 127  
 <211> 7  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

25  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

35  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = N-metilalanina (Nma)

40  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

50  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

5 <400> 127

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 128  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 20 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 30 <223> Xaa = N-metilglicina (sarcosina)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 35 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 40 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 45 <223> Amidación C-terminal

<400> 128

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

50

<210> 129  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 10 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 15 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 20 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> xaa = D-Arg

<220>  
 30 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = Norleucina (NLeu)

<220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 129  
 40

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 130  
 <211> 7  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

50

<220>

<221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Norleucina (dNLeu)

15 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 130

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 131  
 30 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 40 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 50 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 5 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 10 <223> Xaa = D-Norvalina (dNval)

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 131

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

20  
 <210> 132  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 30 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Norvalina (dNval)

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 50 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)



<223> Amidación C-terminal

<400> 132

5 xaa xaa Xaa xaa Xaa xaa Xaa 1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

20 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

25 <220>

<221> VARIANT

<222> (4)

<223> Xaa = D-Ala

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = D-Norleucina (dNLeu)

40 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

45 <400> 133

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 134

50 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Acetilación N-terminal

15 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Xaa = D-Norleucina (dNLeu)

20 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (5), (7)  
<223> Xaa = D-Arg

25 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> Amidación C-terminal

35 <400> 134

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 135  
40 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Péptido sintético

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
50 <223> Xaa = D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

5 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> xaa = D-Arg

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 <223> Xaa = D-Ala

15 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Norvalina (dNVal)

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 135

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 136  
 30 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 40 <223> xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 50 <223> Xaa = D-Norvalina (dNVal)

<220>

<221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

5 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

15 <400> 136

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 137  
 20 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 30 <223> xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 35 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 40 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 45 <223> Xaa = D-Norvalina (dNVal)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 50 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 5  
 <400> 137

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

10 <210> 138  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 20 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 25 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 30 <222> (2), (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (4)  
 <223> Xaa = D-Norleucina (dNLeu)

<220>  
 <221> VARIANT  
 40 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 138

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- <210> 139
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (1)
- <223> Xaa = D-Cys
- 15
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Acetilación N-terminal
- 20
- <220>
- <221> DISULFID
- <222> (1)..(1)
- <223> Enlace con D-homocisteína (dHcy)
- 25
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (2), (6)
- <223> Xaa = D-Ala
- 30
- <220>
- <221> VARIANT
- <222> (3), (4), (5), (7)
- <223> Xaa = D-Arg
- 35
- <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (7)
- <223> Amidación C-terminal
- 40
- <400> 139

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

- 45 <210> 140
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 5 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Enlace con ácido 3-mercaptopropiónico (Mpa)

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 20 <223> Xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

30  
 <400> 140

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

35 <210> 141  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)

45 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 50 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace con L-cisteína acetilada

5

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala

10

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

20

<400> 141

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 142  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> DISULFID  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace con D-cisteína

<220>  
 <221> VARIANT  
 50 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala



<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 5 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 10 <223> Amidación C-terminal

<400> 142

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

15  
 <210> 143  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> péptido sintético

<220>  
 25 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 35 <221> DISULFID  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Enlace con polietilenglicol

<220>  
 40 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(7)  
 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 143

ES 2 607 954 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- <210> 144
- <211> 7
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10 <220>
- <221> VARIANT
- <222> (1)
- <223> Xaa = D-Cys
  
- 15 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Acetilación N-terminal
  
- 20 <220>
- <221> DISULFID
- <222> (1)..(1)
- <223> Enlace con polietilenglicol
  
- 25 <220>
- <221> VARIANT
- <222> (2)..(7)
- <223> Xaa = D-Arg
  
- 30 <220>
- <221> MOD\_RES
- <222> (7)
- <223> Amidación C-terminal
  
- 35 <400> 144

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

- <210> 145
- 40 <211> aa
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 45 <223> Péptido sintético
- <400> 145

Cys Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
1 5

<210> 146  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

10 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

20 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Xaa = D-Arg

25 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6), (7)  
 <223> Xaa = D-Ala

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

35 <400> 146

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 147  
 40 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 50 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Lys  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20  
 <400> 147

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

25 <210> 148  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 35 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 VARIANT  
 <222> (2), (4), (6)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (5), (7)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 148

5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 149

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

20 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

25 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

30 <220>

<221> VARIANT

<222> (4)

<223> xaa = D-Ala

35 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> Amidación C-terminal

40 <400> 149

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5

<210> 150

45 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 5 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> Acetilación N-terminal

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (5), (7)  
 15 <223> Xaa = D-Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)  
 20 <223> xaa = D-Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 25 <223> Xaa = D-Gln

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 30 <223> Amidación C-terminal

<400> 150

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

35 <210> 151  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 50 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (4)

<223> Xaa = D-Ala

<220>

<221> VARIANT

15 <222> (6)

<223> Xaa = D-His

<220>

<221> MOD\_RES

20 <222> (7)

<223> Amidación C-terminal

<400> 151

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
<sub>1</sub> <sub>5</sub>

25

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = D-Cys

40 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Acetilación N-terminal

45 <220>

<221> VARIANT

<222> (2), (3), (5), (7)

<223> Xaa = D-Arg

50 <220>

<221> VARIANT

<222> (4)  
 <223> xaa = D-Ala  
  
 <220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = D-Ile  
  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 152  
 15  
  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
   1                                  5  
  
 <210> 153  
 <211> 6  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 25  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal  
 35  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (5)  
 <223> Xaa = D-Ala  
 40  
 <220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Enlace con ácido 1,3-diaminopropiónico (DAP)  
 45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (6)  
 <223> Xaa = D-Arg  
 50  
 <220>



<221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Amidación C-terminal

5 <400> 153

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 154  
 10 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 15 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Acetilación N-terminal

25  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 <223> xaa = D-Ala

30  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (5)  
 <223> Xaa = D-Homoarginina

35  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (7)  
 <223> Xaa = D-Arg

40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7)  
 <223> Amidación C-terminal

45  
 <400> 154

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 155  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido sintético

<220>

10 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico que contiene tiol

<220>

15 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

<220>

20 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (7)  
 <223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico

<220>

25 <221> VARIANT  
 <222> (5)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico catiónico

<220>

30 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

<400> 155

35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 156

<211> 7

40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45 <220>

<221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

50 <220>

<221> VARIANT

<222> (2)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

<220>  
 5 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (7)  
 <223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico

<220>  
 10 <221> VARIANT  
 <222> (5)  
 <223> Xaa = D-Arg, L-Arg, D-Lys o L-Lys

<220>  
 15 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

<400> 156  
 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 157  
 <211> 7  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

30  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> xaa = D-Cys

35  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (3), (4)  
 <223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico

40  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5), (7)  
 <223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico catiónico

45  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

50  
 <400> 157

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 158  
 5 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 15 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2), (6)  
 20 <223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3), (4), (7)  
 25 <223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (5)  
 30 <223> Xaa = D-Arg, L-Arg, D-Lys o L-Lys

<400> 158

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

35 <210> 159  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

<220>  
 45 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = D-Cys

<220>  
 50 <221> VARIANT

<222> (2)  
<223> Xaa = D-Ala

<220>  
5 <221> VARIANT  
<222> (3), (4), (7)  
<223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico catiónico

<220>  
10 <221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> xaa = D-Arg

<220>  
15 <221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala  
<400> 159

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

20  
<210> 160  
<211> 7  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

30 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = D-Cys

35 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (3), (7)  
<223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico catiónico

40 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (4)  
<223> Xaa = D-Ala

45 <220>  
<221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> Xaa = D-Arg

50 <220>  
<221> VARIANT

ES 2 607 954 T3

<222> (6)  
<223> Xaa = D-Ala

<400> 160

5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 162

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 162

His Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Asp  
1 5

20 <210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 163

30

Cys His Asp Ala Pro Ile Gly Tyr Asp  
1 5

<210> 164

<211> 11

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 164

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

45 <210> 165

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Péptido sintético  
  
<400> 165

Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

10

<210> 166  
<211> 11  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

20 <400> 166

Cys Ser Phe Asn Ser Tyr Glu Leu Gly Ser Leu  
1 5 10

<210> 167  
25 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Péptido sintético

<400> 167

Cys Pro Asp Tyr His Asp Ala Gly Ile  
1 5

35

<210> 168  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 168

45

ES 2 607 954 T3

Cys Glu Ala Val Ser Leu Lys Pro Thr  
1 5

- <210> 169
- <211> 8
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10
- <400> 169

Glu Ser Val Ser Leu Lys Pro Thr  
1 5

- 15 <210> 170
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> Péptido sintético
  
- <400> 170

Cys Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val  
1 5 10

- 25
- <210> 171
- <211> 6
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> Péptido sintético
  
- 35 <400> 171

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg  
1 5

- <210> 172
- 40 <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- 45 <223> Péptido sintético



<400> 172

Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg  
1 5

5 <210> 173  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido sintético  
  
<400> 173

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg  
1 5 10

15  
  
<210> 174  
<211> 12  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Péptido sintético

25 <400> 174

Cys Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg  
1 5 10

<210> 175  
30 <211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Péptido sintético  
  
<400> 175

Cys Arg Arg Arg  
1

40  
<210> 176  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 176

Cys Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 177

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 177

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

20

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 178

30

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

<210> 179

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 179

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

45 <210> 180

<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Péptido sintético  
  
<400> 180

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

10

<210> 181  
<211> 12  
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Péptido sintético

20 <400> 180

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 182  
25 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Péptido sintético  
  
<400> 182

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

35

<210> 183  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> Péptido sintético

<220>  
45 <221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Xaa = L-Cys

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2), (6)  
<223> Xaa = un residuo aminoacídico no catiónico

5

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3), (4), (7)  
<223> Xaa = cualquier residuo aminoacídico

10

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> Xaa = D-Arg, L-Arg, D-Lys o L-Lys

15

<400> 183

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto, que comprende un péptido y un grupo de conjugación, donde el péptido comprende una secuencia aminoacídica que tiene la fórmula:

5



donde

- 10  $X_1$  es D-cisteína;  
 $X_2$  es D-arginina, D-alanina, D-valina, D-leucina, D-fenilalanina, D-serina, D-glutamina, D-norleucina o D-norvalina;  
 $X_3$  es D-arginina;  
 $X_4$  es D-arginina o un aminoácido no catiónico, donde  $X_4$  no es glicina, prolina o un aminoácido con una cadena lateral ácida;  
 15  $X_5$  es D-arginina;  
 $X_6$  es D-alanina, D-glicina o D-serina;  
 $X_7$  es D-arginina;

donde al menos dos de  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  son independientemente una subunidad catiónica; y

20 donde el péptido está unido en su extremo N al grupo de conjugación mediante un enlace disulfuro.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto comprende Ac-crrrarar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) o Ac-carrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26).

25 3. El compuesto de la reivindicación 1, donde el péptido tiene de 8 a 11, de 8 a 10 o de 8 a 9 aminoácidos de largo.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el grupo de conjugación se selecciona entre L-cisteína, D-cisteína, homocisteína, glutatión, cisteína pegilada o un polipéptido  
 30 que contiene un residuo cisteína.

5. El compuesto de la reivindicación 4, donde el grupo de conjugación es cisteína, donde la cisteína es una cisteína N-acetilada.

35 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde el polipéptido que contiene un residuo cisteína tiene la misma secuencia que el péptido.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde el compuesto comprende:



40

o



45 8. Un compuesto que consiste en un péptido que comprende la secuencia carrrar (SEQ ID NO:2) y un grupo de conjugación, dicho péptido unido por un enlace disulfuro.

9. El compuesto de la reivindicación 8, donde el péptido está químicamente modificado en el extremo N, el extremo C, o ambos.
10. El compuesto de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde el compuesto es Ac-c(C)arrar-NH<sub>2</sub> 5 (SEQ ID NO:3).
11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el compuesto es Ac-c(C)rrrar-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28).
- 10 12. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece hiperparatiroidismo secundario (SHPT) o un trastorno hipercalcémico.
13. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las 15 reivindicaciones 1 a 11, para su uso en la disminución de los niveles de hormona paratiroidea en un sujeto.
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, que comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico que es vitamina D, un análogo de vitamina D o clorhidrato de cinacalcet.

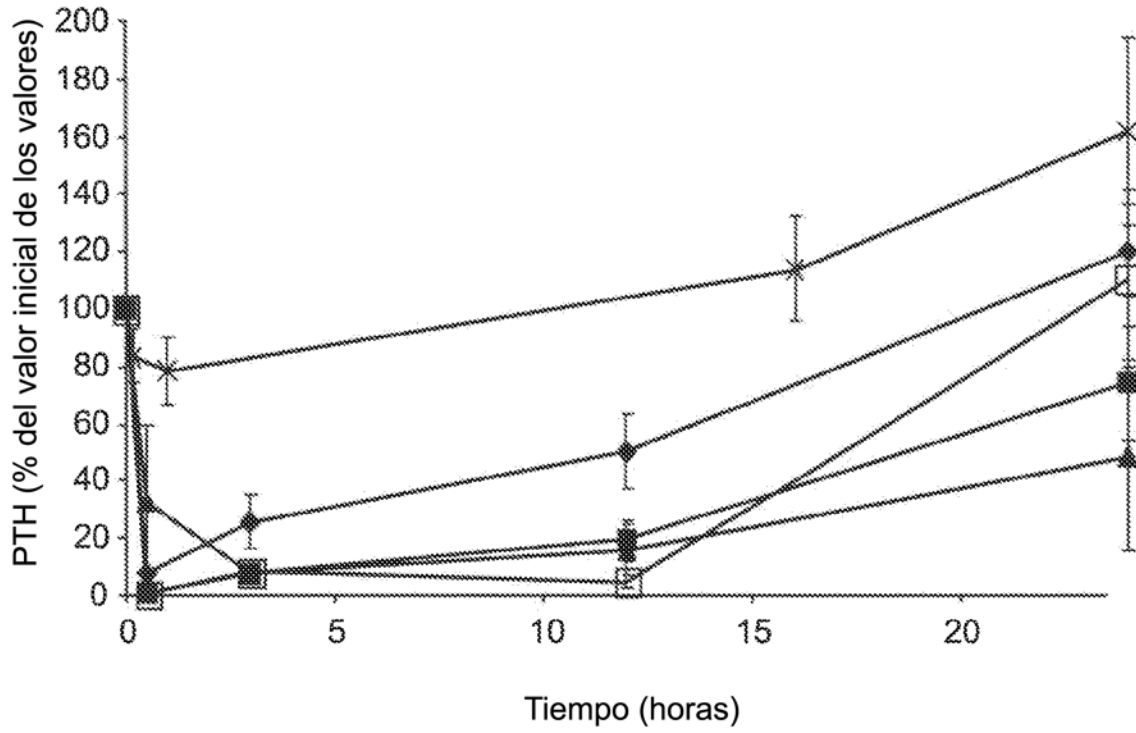


FIG. 1

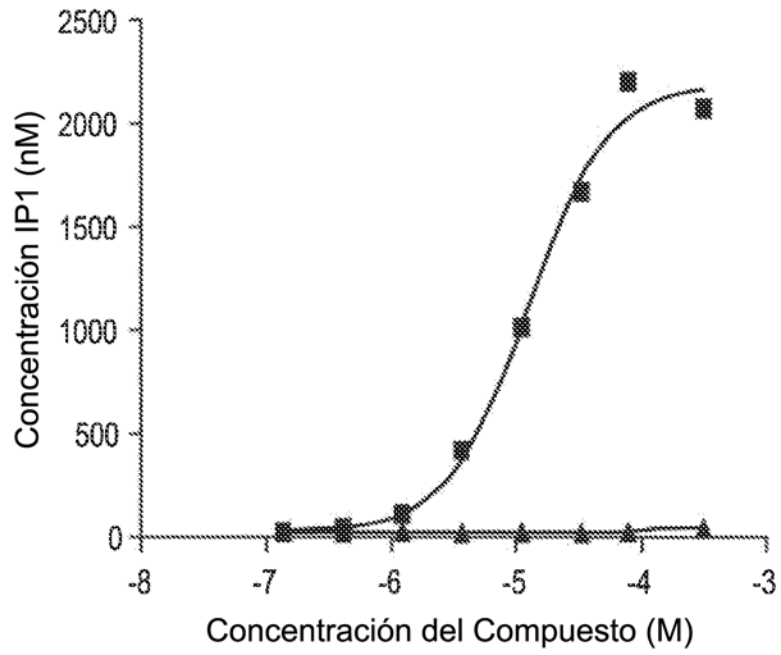


FIG. 2A

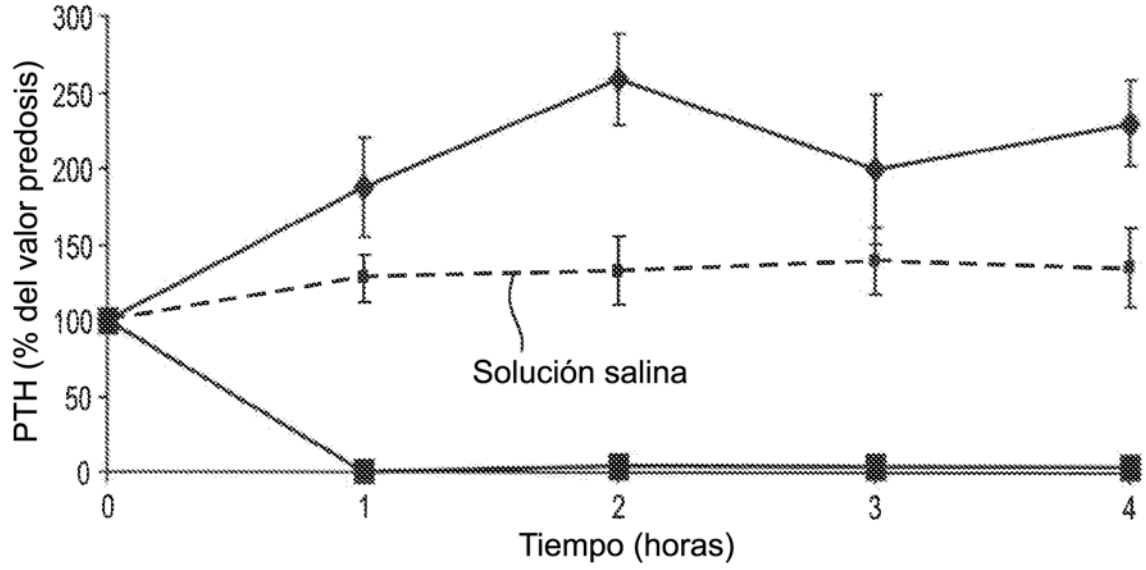


FIG. 2B

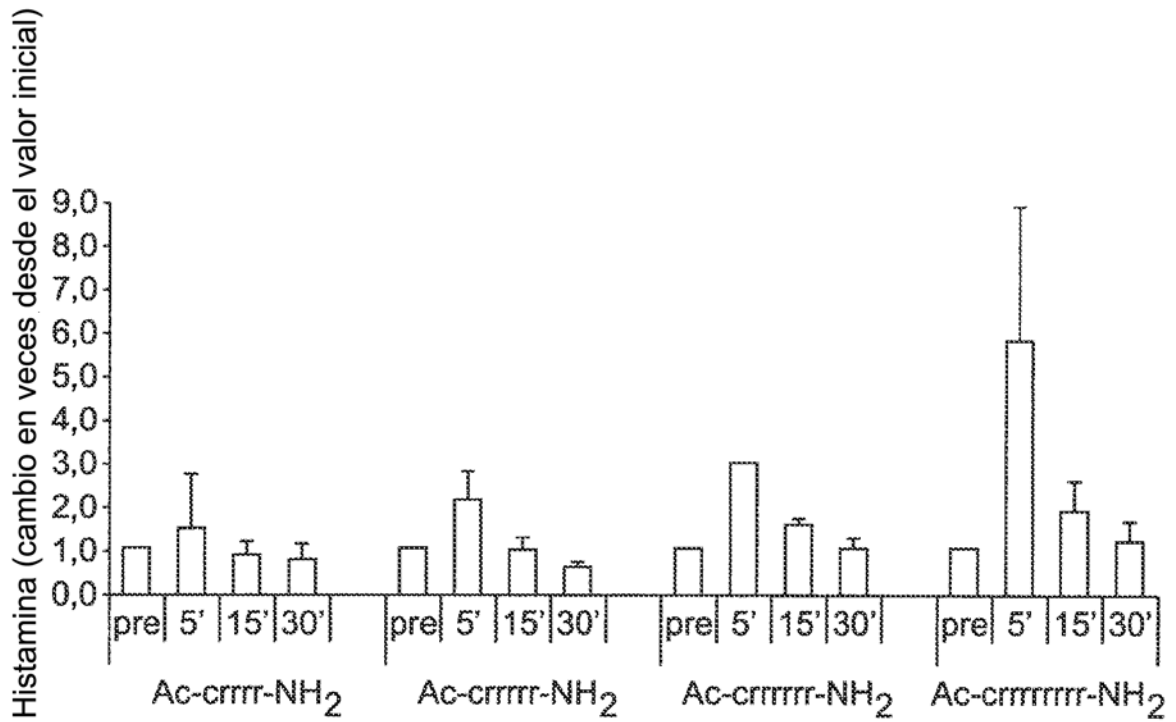
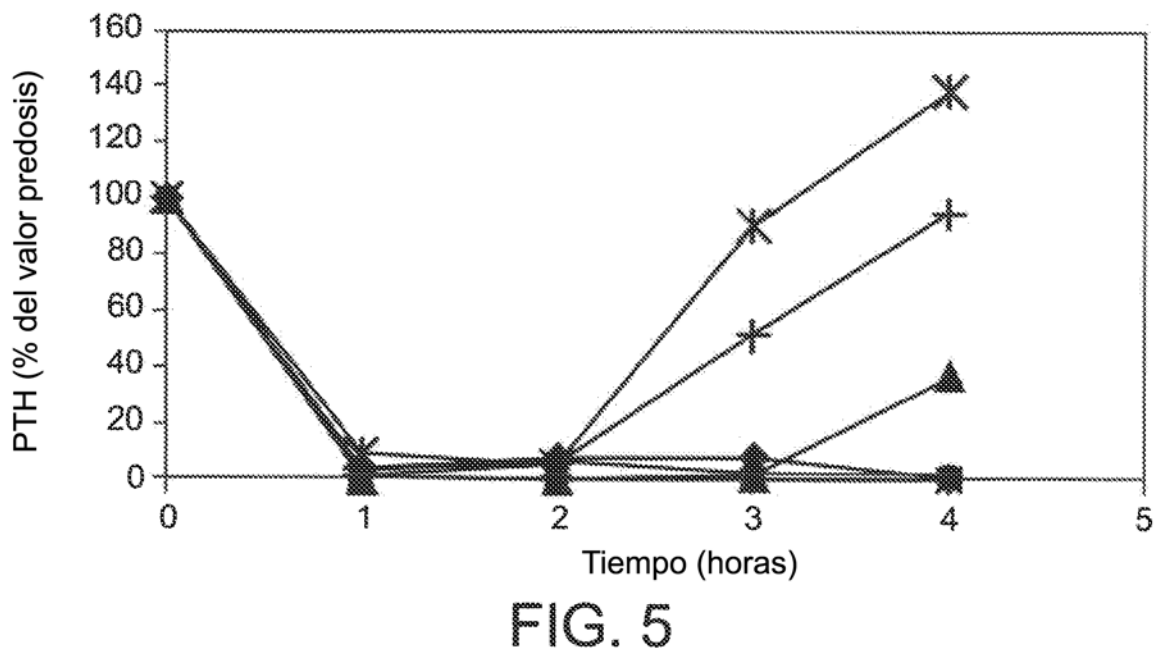
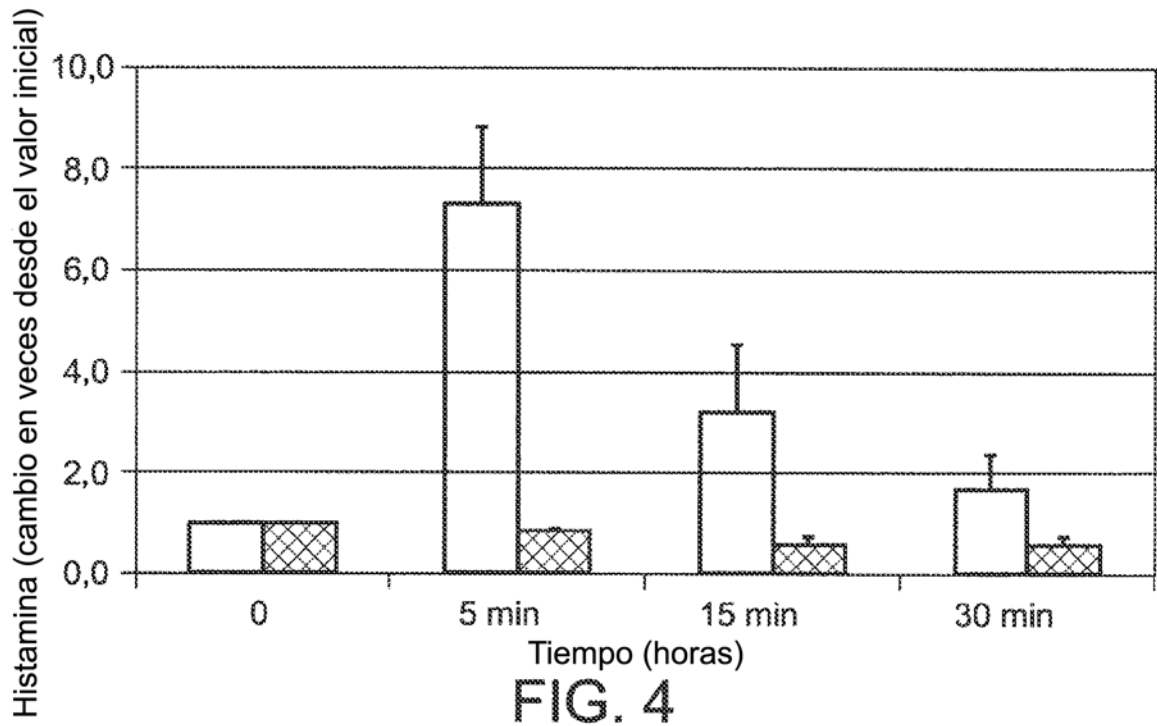


FIG. 3





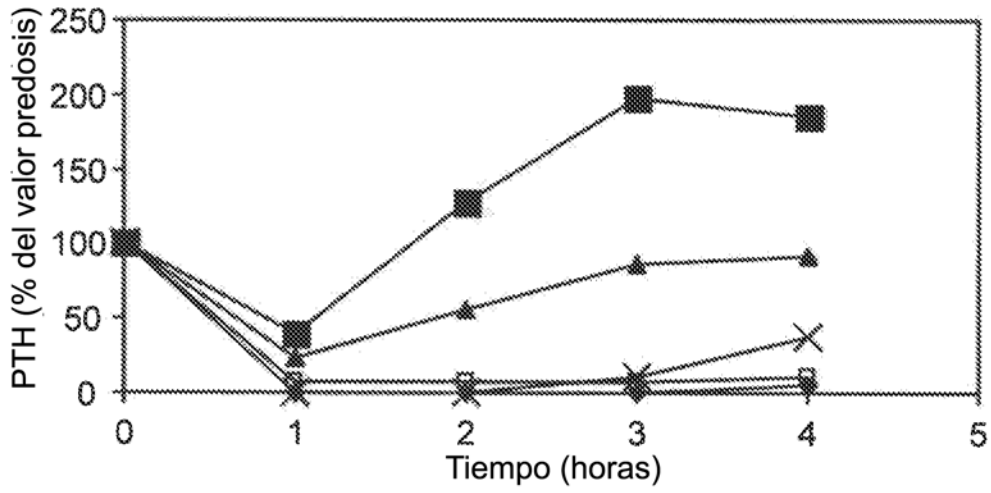


FIG. 6A

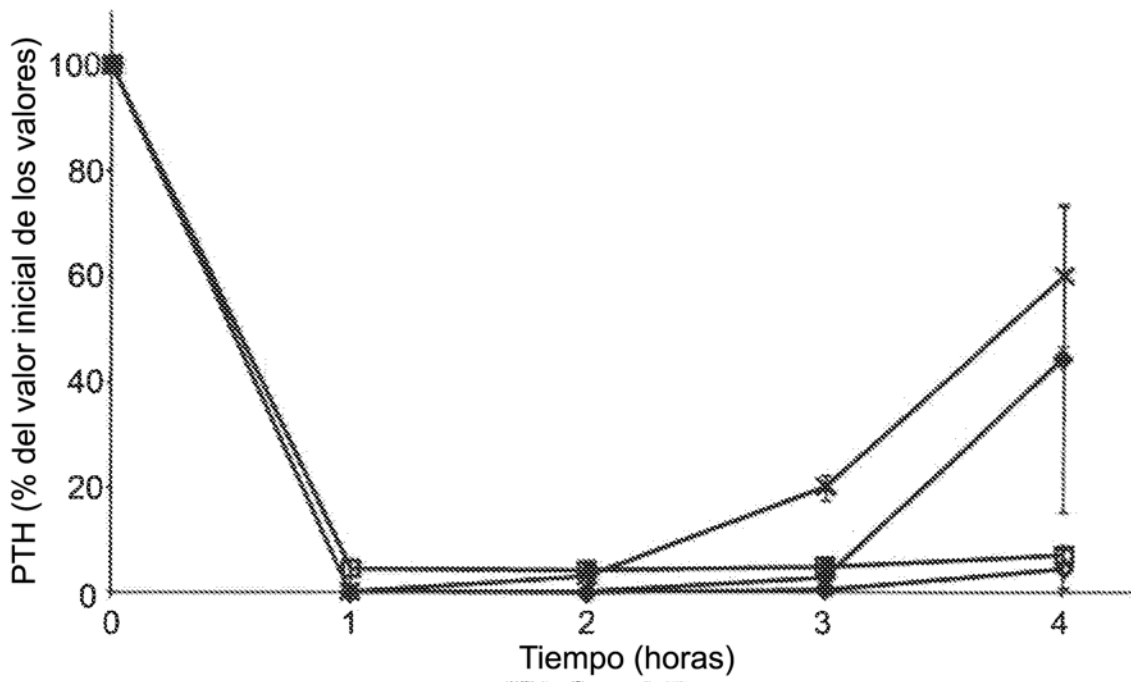


FIG. 6B

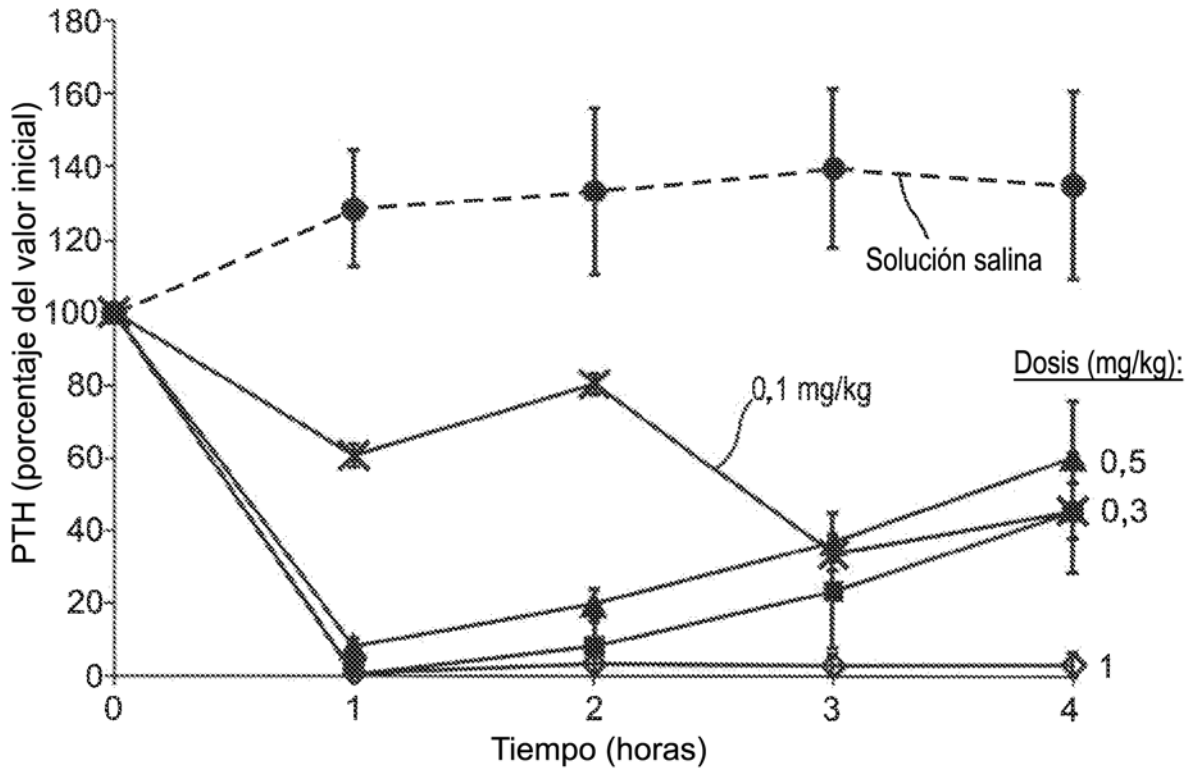


FIG. 7

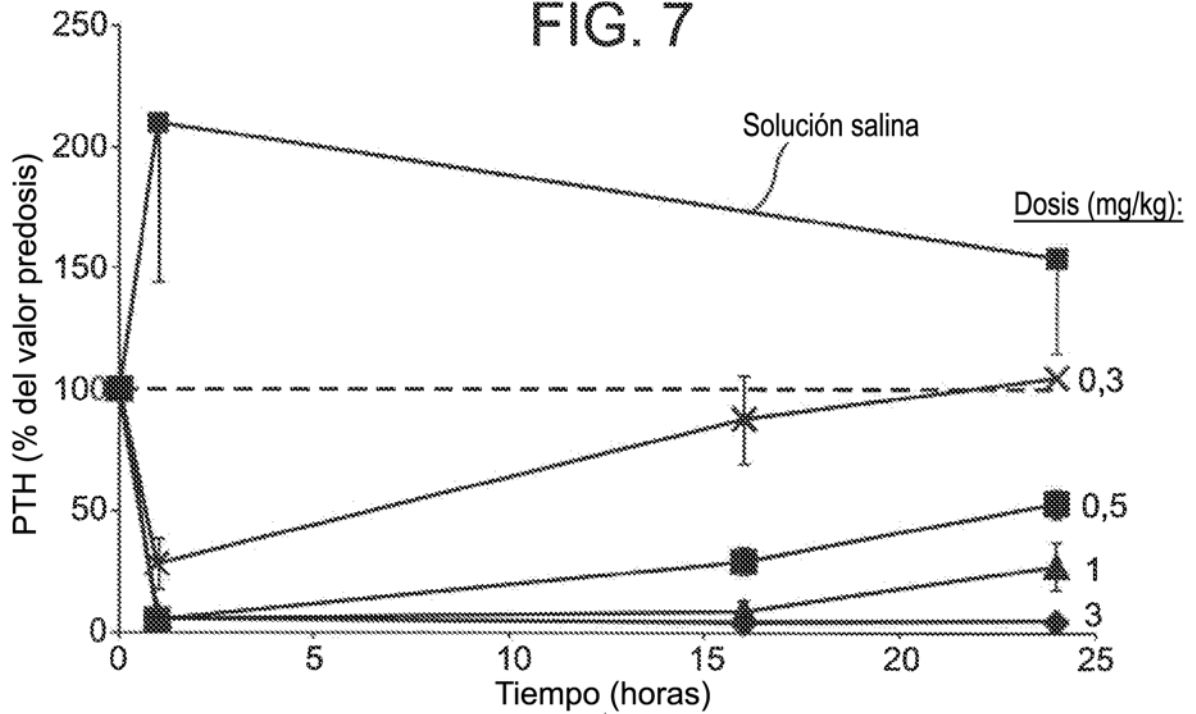


FIG. 8

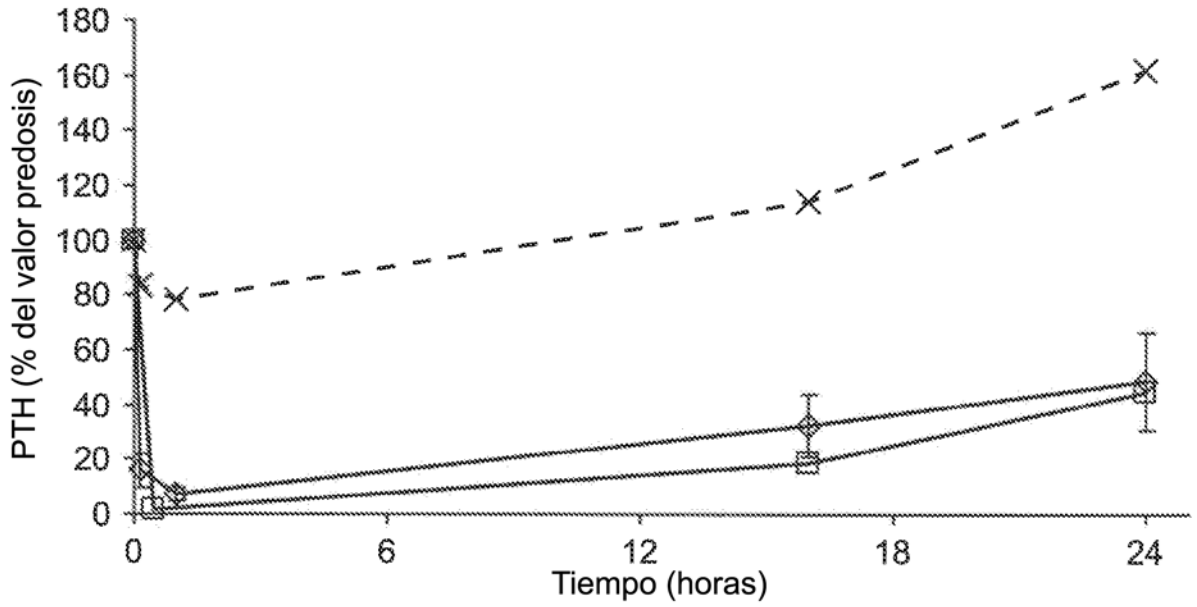


FIG. 9

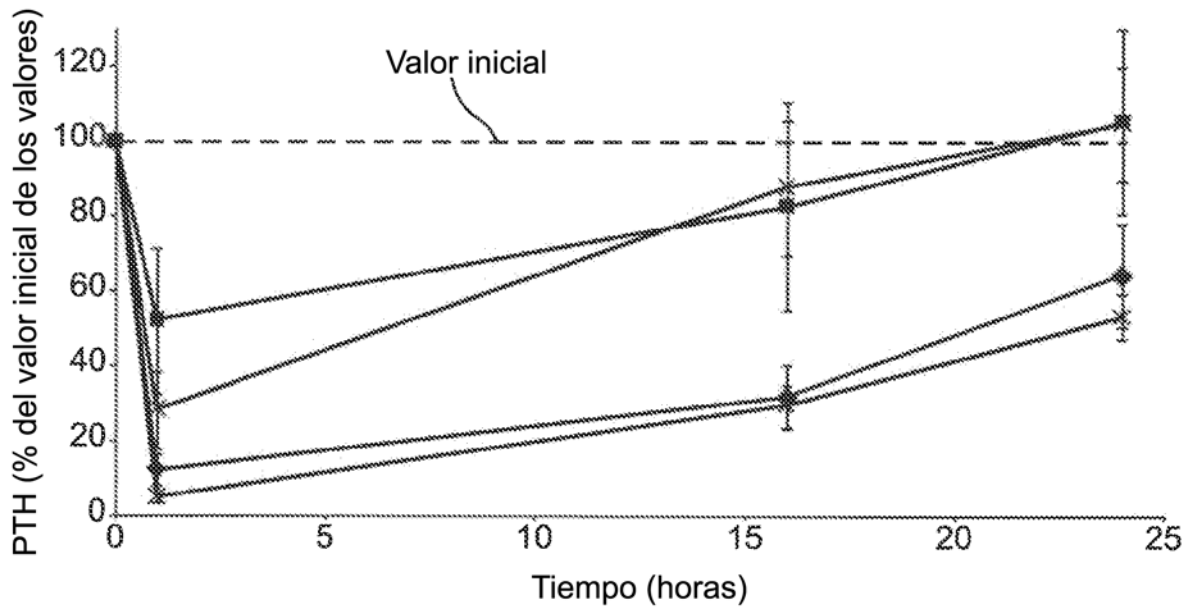


FIG. 10

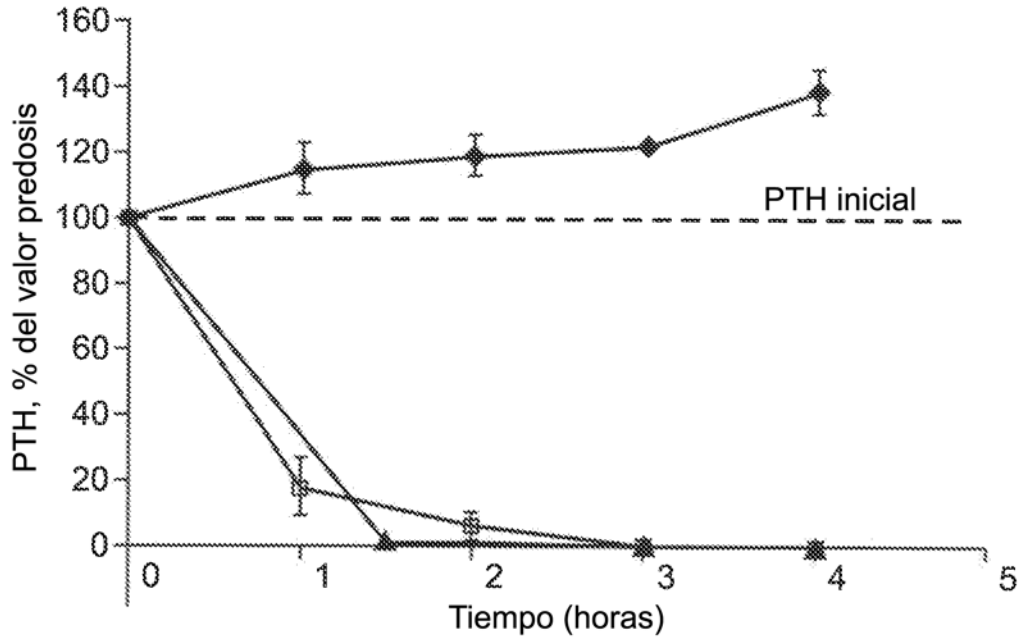


FIG. 11

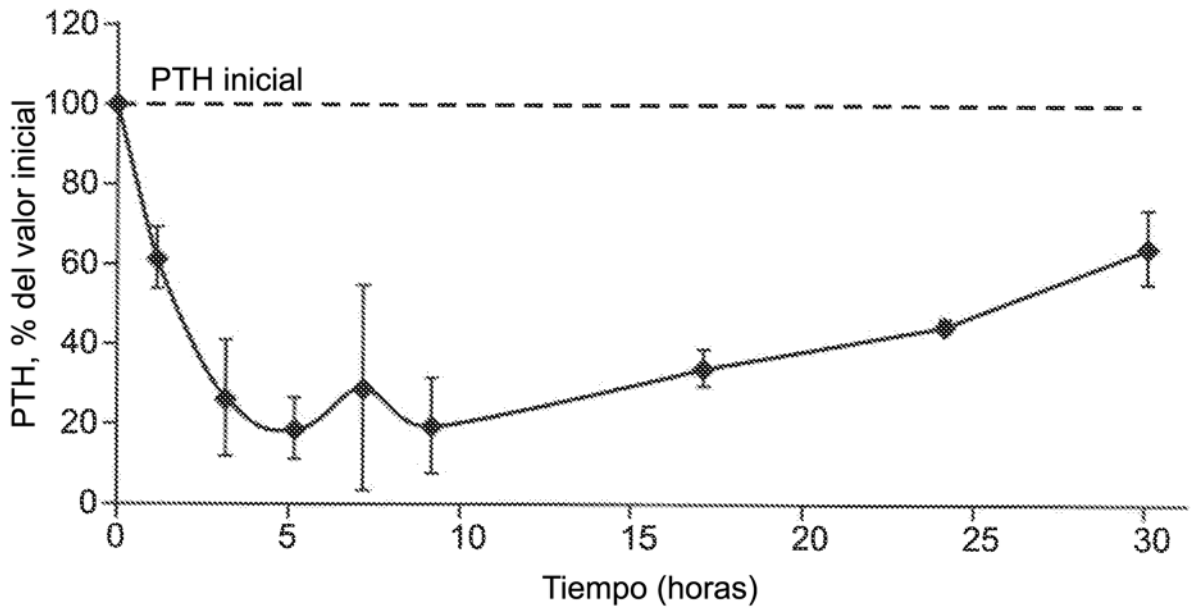


FIG. 12

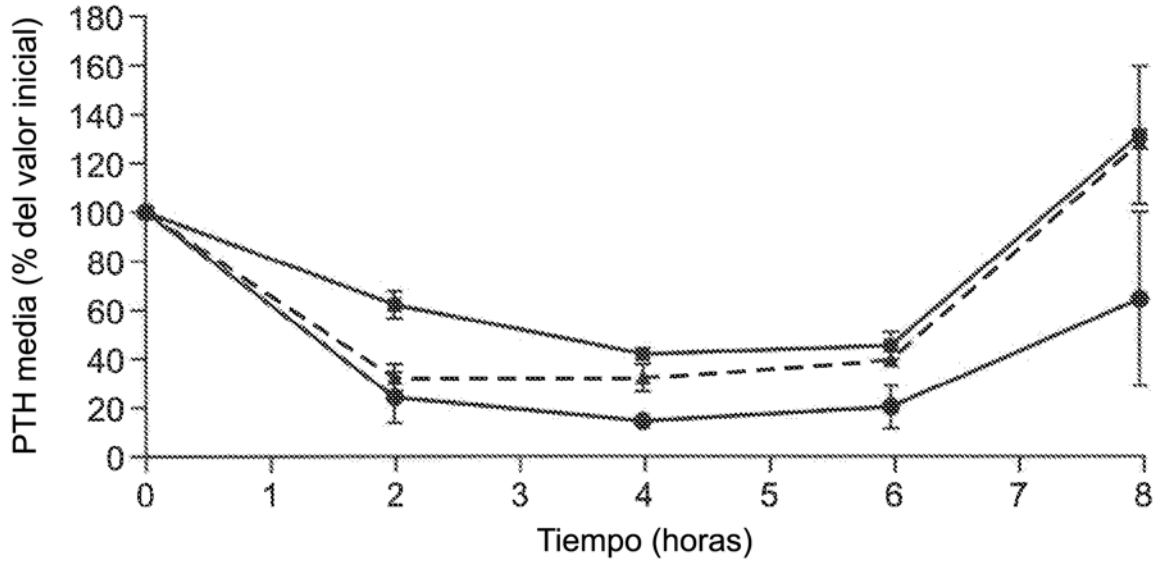


FIG. 13

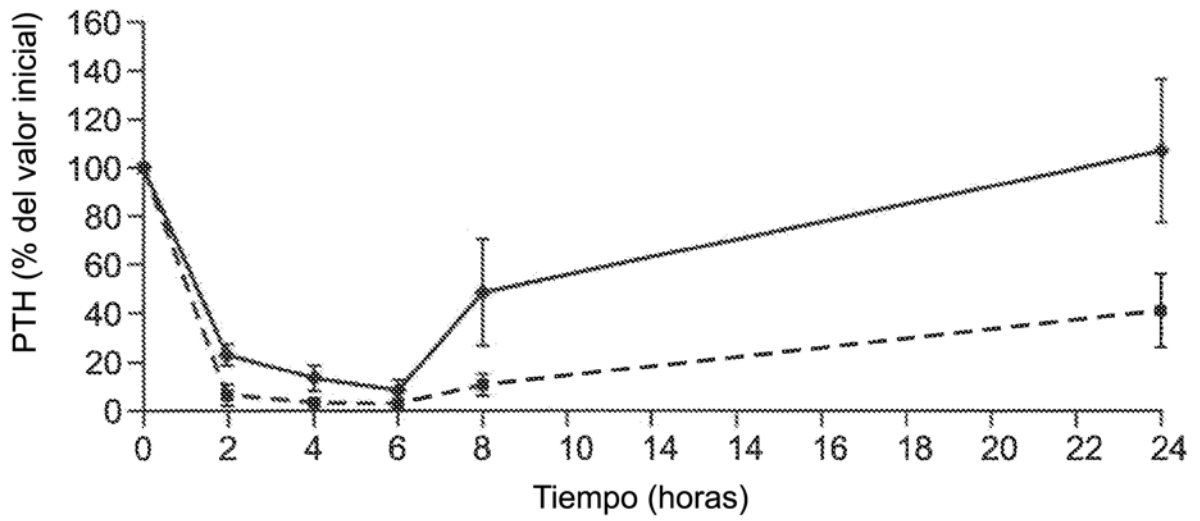


FIG. 14A

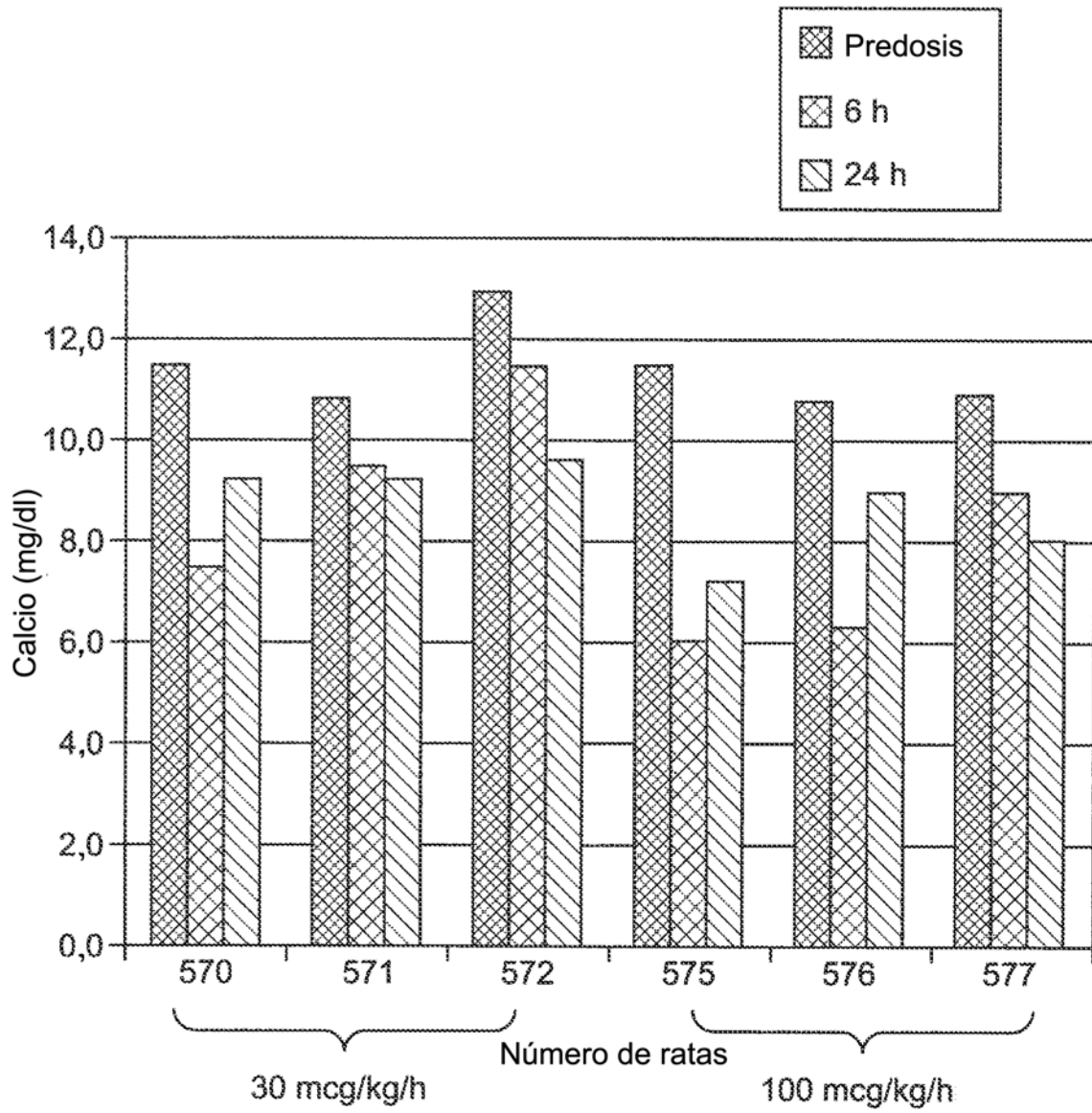


FIG. 14B