

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 501**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2009 PCT/EP2009/063724**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10046357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009 E 09752134 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2340261**

54 Título: **Derivados de amilina**

30 Prioridad:

21.10.2008 EP 08167154
28.05.2009 EP 09161372

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

SCHÄFFER, LAUGE;
KRUSE, THOMAS;
LAU, JESPER y
THØGERSEN, HENNING

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 662 501 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

Derivados de amilina

CAMPO DE LA INVENCION

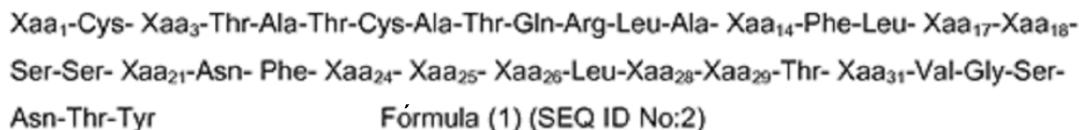
- 5 La invención se refiere a derivados de amilina humana o análogos de estos que se unen a la albúmina y/o al receptor de amilina, composiciones farmacéuticas que comprenden estos derivados y derivados de amilina para su uso como medicamentos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Un número importante cada vez mayor de personas padecen diabetes mellitus y obesidad. La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa se pierde parcial o completamente.
- 10 Varios planes de tratamiento actúan sobre un exceso de glucosa en sangre mientras que otros se centran principalmente en la reducción del peso. El agente antidiabético más eficaz utilizado para reducir la glucosa en sangre es la insulina y análogo(s) de esta. Se sabe desde hace mucho tiempo que cuando se utiliza la insulina tradicional para tratar la diabetes, esto se asocia con un aumento del peso corporal. La insulina ha de inyectarse por vía subcutánea hasta varias veces al día.
- 15 Por lo general, la diabetes de tipo 2 se trata en las fases iniciales con dieta y ejercicio. Según avanza la afección, se añaden diversos agentes antidiabéticos orales. En esta etapa también se pueden utilizar agentes inyectados tales como análogos de GLP-1. En general, estos agentes son los que presentan la mayor eficacia en pacientes con células beta funcionales capaces de liberar insulina y amilina.
- 20 La amilina humana es un péptido con una longitud de 37 aminoácidos que tiene propiedades fisicoquímicas que complican su uso como un fármaco. En particular, tiene tendencia a fibrilar *in vitro* y/o *ex vivo* y se vuelve ineficaz debido a la precipitación. Además, la amilina resulta difícil de formular ya que precipita a pH fisiológico. Por lo tanto, se formula en una solución ácida.
- 25 En la actualidad se puede adquirir en el mercado un producto farmacéutico comercializado con el nombre comercial Symlin®. El producto contiene un análogo de la amilina humana denominado pramlintida. Comparada con la amilina humana, los aminoácidos en la posición 25, 28 y 29 en la pramlintida están sustituidas por prolina. Esta modificación reduce la tendencia fibrilante de la proteína. Es difícil mantener la pramlintida en solución a pH neutro y, por lo tanto, se proporciona en una solución ácida, es decir, Symlin®. Otra desventaja es que es necesario inyectar Symlin en sitios de inyección independientes tres veces al día.
- 30 La solicitud de patente internacional n.º EP2008/062036 divulga derivados de amilina que tienen un residuo de unión a la albúmina. Aunque los derivados de amilina muestran mejoras en las propiedades farmacocinéticas (PK, por sus siglas en inglés) o farmacodinámicas (PD, por sus siglas en inglés) en comparación con la pramlintida aún tienden a fibrilar y son difíciles de mantener en solución a pH 4.

COMPENDIO DE LA INVENCION

- 35 Sorprendentemente, se ha observado que los derivados de amilina, donde el aminoácido en la posición 17 ha sido reemplazado por cualquier aminoácido natural excepto Val, Lys o Ala, presenta una reducción de la tendencia a fibrilar y muestra un incremento de la estabilidad cuando se formula a pH ácido. Los derivados de amilina de la presente invención tienen a la vez un perfil farmacocinético prolongado y buenas propiedades farmacodinámicas. Por lo tanto, los derivados de amilina de acuerdo con la presente invención no se han de inyectar tan a menudo como los derivados de amilina conocidos.
- 40 En un aspecto, la invención trata sobre un derivado de amilina que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula 1:



donde

- Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente entre Lys, Arg, His y Glu;
- 45 Xaa₃ se selecciona independientemente entre Asn y Lys;
- Xaa₁₄ se selecciona independientemente entre Glu, Asn, Gln y Asp;

- Xaa₁₇ se selecciona independientemente entre His y Arg;
- Xaa₁₈ se selecciona independientemente entre His o Arg;
- Xaa₂₁ se selecciona independientemente entre Asp, Asn y Gln;
- Xaa₂₄ se selecciona independientemente entre Glu y Gly;
- 5 Xaa₂₅ se selecciona independientemente entre Ala y Pro;
- Xaa₂₆ se selecciona independientemente entre Pro e Ile;
- Xaa₂₈ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- Xaa₂₉ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- Xaa₃₁ se selecciona independientemente entre Glu y Asn;
- 10 el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- donde un sustituyente se conecta al residuo aminoacídico Xaa₁ o la Cys en la posición 2, comprendiendo dicho sustituyente un resto de unión a la albúmina.

En un aspecto, la invención trata sobre una composición farmacéutica que comprende un derivado de amilina de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 En un aspecto, la invención trata sobre un derivado de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La figura 1a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 3.
- 20 La figura 1b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 3.
- La figura 2a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 5.
- 25 La figura 2b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 5.
- La figura 3a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 6.
- 30 La figura 3b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 6.
- La figura 4a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 7.
- 35 La figura 4b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) 4a en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 7.
- La figura 5a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 8.
- 40 La figura 5b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 8.
- La figura 6a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 9.

La figura 36b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 57.

5 La figura 37a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 58.

La figura 37b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 58.

10 La figura 38a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 59.

La figura 38b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 59.

15 La figura 39a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 63.

La figura 39b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 63.

20 La figura 40a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 64.

La figura 40b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 64.

25 La figura 41a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 66.

La figura 41b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 66.

30 La figura 42a muestra la ingesta de alimentos durante 48 horas de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I). Datos= media. n= 5-7. Círculos blancos: vehículo. Cuadrados negros: 30 nmol/kg del compuesto 67.

La figura 42b muestra la ingesta de alimentos acumulada de acuerdo con el Ensayo farmacológico (I) en las primeras 24 horas, el periodo de 24 a 48 horas y el periodo completo de 48 horas. Datos= media. n= 5-7. Barras grises: vehículo. Barras negras: 30 nmol/kg del compuesto 67.

DEFINICIONES

35 La expresión «**amilina humana**», tal como se utiliza en la presente, se refiere al péptido del amilina humana que tiene la secuencia tal como se representa en la SEQ ID NO: 1. El término incluye, sin carácter limitante, una hormona peptídica de 37 aminoácidos denominada amilina, la cual es secretada conjuntamente con la insulina de manera natural por las células β del páncreas. La amilina humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-
40 Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr (SEQ ID NO: 1) que se muestra a continuación con un puente disulfuro entre los dos residuos de Cys y un grupo amida C-terminal.



45 En el presente texto, la expresión «**análogo procedente de la amilina humana**» o «**análogo de la amilina humana**» se utiliza para designar un péptido donde uno o más residuos aminoacídicos de la amilina humana han sido modificados independientemente sustituyéndolos por otros residuos aminoacídicos y/o eliminando uno o más residuos aminoacídicos y/o añadiendo uno o más residuos aminoacídicos. El número de inserciones, adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos puede ser de al menos 1 pero pueden estar presentes hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 inserciones, adiciones, deleciones o sustituciones. La sustitución o adición se puede realizar con cualquier aminoácido natural o no natural, aminoácidos sintéticos, peptidomiméticos u otros compuestos químicos.

La adición o deleción de residuos aminoacídicos puede tener lugar en el extremo N del péptido y/o en el extremo C del péptido.

5 Cuando se utiliza en la presente la expresión «**aminoácido natural**» es un aminoácido (con los códigos de tres letras y los códigos de una letra habituales entre paréntesis) seleccionado a partir del grupo constituido por: glicina (Gly y G), prolina (Pro y P), alanina (Ala y A), valina (Val y V), leucina (Leu y L), isoleucina (Ile e I), metionina (Met y M), cisteína (Cys y C), fenilalanina (Phe y F), tirosina (Tyr y Y), triptófano (Trp y W), histidina (His y H), lisina (Lys y K), arginina (Arg y R), glutamina (Gln y Q), asparagina (Asn y N), ácido glutámico (Glu y E), ácido aspártico (Asp y D), serina (Ser y S) y treonina (Thr y T). Si, debido a errores tipográficos, se producen desviaciones de los códigos utilizados habitualmente, los códigos utilizados habitualmente prevalecerán. Los aminoácidos presentes en los derivados de amilina de esta invención son, preferentemente, aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico.

15 El término «**conector**», tal como se utiliza la presente, se refiere a un resto químico con el que se separa el resto de unión a la albúmina y el análogo de la amilina humana al tener el conector entre ellos. Por ejemplo, el conector puede comprender uno o dos aminoácidos que en un extremo se unen al resto de unión a la albúmina y en el otro extremo se unen al aminoácido de la posición 1 del análogo de la amilina humana, o cuando se elimina el aminoácido en la posición 1, el conector se une a la Cys en la posición 2 del análogo de la amilina humana. El resto químico del conector puede contribuir/potenciar el efecto de unión a la albúmina del sustituyente, por ejemplo, un conector que comprende yGlu potencia el efecto de unión a la albúmina del derivado de amilina.

20 El término «**potencia**» se utiliza para describir el efecto de un compuesto concreto en los ensayos en los que se ha establecido una relación sigmoidea entre el log de la concentración y el efecto de un compuesto. Además, la respuesta debería variar entre un 0 y un 100%. Se puede utilizar la CE(concentración eficaz)₅₀ para describir la concentración de un compuesto concreto que genera una respuesta de un 50% en el ensayo.

25 El término «**actividad**» se refiere en un aspecto a la capacidad de reducir el apetito y/o aumentar la saciedad. La actividad se puede medir según la capacidad de reducir el apetito tal como se describe, por ejemplo, en los Ensayos farmacológicos I y II en la sección Ensayos.

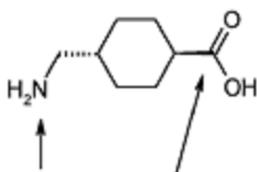
30 La expresión «**estabilidad física**» de un derivado de amilina de acuerdo con la invención o una formulación proteica de acuerdo con la invención, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la tendencia de la proteína a no formar agregados insolubles y/o biológicamente inactivos de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estreses termomecánicos y/o a la interacción con superficies interfaciales y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies y superficies interfaciales hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas se puede evaluar mediante una inspección visual, el ensayo de fibrilación de ThT y/o medidas de la turbidez tal como se describe en otra sección de la presente. La inspección visual de las formulaciones se lleva a cabo en una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza mediante una puntuación visual que evalúa el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (a una formulación que no presente turbidez le corresponde una puntuación visual de 0 y a una formulación que presente turbidez visual a la luz del día le corresponde una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable respecto a la agregación de proteínas cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación se puede evaluar mediante medidas simples de la turbidez con las cuales estará familiarizado el experto.

40 La expresión «**estabilidad química**» del derivado de amilina de acuerdo con la invención o de la formulación farmacéutica o una formulación farmacéutica se refiere a la ausencia de cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que, por lo tanto, no conllevan la formación de productos de degradación química con una posible reducción de la potencia biológica y/o un posible incremento de las propiedades inmunógenas en comparación con la estructura nativa de la proteína. Se pueden formar varios productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y del entorno al cual se exponga la proteína. Lo más probable es que la eliminación de la degradación química no se pueda evitar completamente y se suelen observar cantidades cada vez mayores de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación proteica, como bien sabe el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas tienen tendencia a experimentar desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de la cadena lateral en los residuos de glutamilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación conllevan la formación de productos de transformación de elevado peso molecular, donde dos o más moléculas proteicas se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones de disulfuro, que conllevan la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. y Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación proteica se puede evaluar midiendo la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos temporales tras la exposición a diferentes condiciones medioambientales (la formación de productos de degradación se puede acelerar a menudo, por ejemplo, incrementando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se suele determinar mediante la separación de los productos de degradación según su tamaño molecular y/o su carga utilizando varias técnicas cromatográficas (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

La expresión «**formulación estabilizada**» se refiere a una formulación con un incremento de la estabilidad física, un incremento de la estabilidad química o un incremento de la estabilidad física y química en comparación con una solución acuosa del péptido.

5 La «**afinidad de unión a la albúmina**» se puede determinar mediante varios métodos conocidos en la técnica. En un método, el derivado que se va a medir se radiomarca con, por ejemplo, ^{125}I o ^3H y se incuba con albúmina inmovilizada (Kurtzhals *et.al.*, *Biochem.J.*, 312, 725-731 (1995)). Se calcula la unión del derivado respecto a un patrón. En otro método, se radiomarca un compuesto relacionado y su unión a la albúmina inmovilizada en, por ejemplo, microesferas de SPA, tiene que competir con una serie de diluciones del derivado que se va a medir. El valor de CE50 de la competición es una medida de la afinidad del derivado. En un tercer método, se mide la afinidad por el receptor o la potencia de un derivado con diferentes concentraciones de albúmina y el cambio respecto a la afinidad o potencia del derivado como una función de la concentración de albúmina refleja su afinidad por la albúmina.

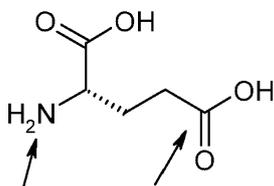
Al utilizar el término «**Trx**» o la expresión «**ácido *trans*-4-(aminometil)ciclohexanocarboxílico**» se hace referencia a un aminoácido con la siguiente estructura:



15 nitrógeno y grupo carboxi
de los enlaces amidas a los dos residuos vecinos

ácido *trans*-4-(aminometil)ciclohexanocarboxílico

Al utilizar el término «**γGlu**» se hace referencia a un aminoácido con la siguiente estructura:



20 α-nitrógeno y grupo γ-carboxi de los enlaces amida
a los dos residuos vecinos

El término «**GABA**» se refiere al ácido gamma-aminobutírico.

25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la siguiente sección, también pueden ser útiles aquellos aspectos comprendidos fuera del alcance de las reivindicaciones para comprender la invención.

30 Ha resultado sorprendente descubrir que los derivados de amilina, donde el aminoácido en la posición 17 ha sido reemplazado por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por His, Ser, Gly, Arg y Pro, presentan una mejora de la estabilidad. Los derivados de amilina presentan una reducción de la tendencia a fibrilar y muestran una mejora de la estabilidad cuando se formulan a pH ácido. Los derivados de amilina de la presente invención tienen a la vez un perfil farmacocinético prolongado y buenas propiedades farmacodinámicas. Por lo tanto, los derivados de amilina de acuerdo con la presente invención no se han de inyectar tan a menudo como los derivados de amilina conocidos.

35 En un aspecto, la invención trata sobre un derivado de amilina, que es un análogo de la amilina humana que tiene un sustituyente unido al grupo α-amino del residuo aminoácido N-terminal o a un residuo de Lys en el análogo de la amilina humana, donde el sustituyente comprende un resto de unión a la albúmina y el residuo aminoácido en la posición 17 del análogo de la amilina humana es cualquier aminoácido natural excepto Val, Lys o Ala y donde la numeración de aminoácidos del análogo de la amilina humana corresponde a la numeración de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el residuo aminoácido en la posición 17 es His, Ser, Gly, Pro o Arg.

En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina está unido al grupo ε-amino del residuo de lisina. En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina está unido mediante el grupo alfa-amino del residuo de lisina.

5 Los derivados de amilina que tienen un aminoácido natural excepto Val, Lys o Ala en la posición 17 del análogo de la amilina humana, por ejemplo, His, Ser, Gly, Arg o Pro en la posición 17 muestran mejores propiedades biofísicas, por ejemplo, una reducción de la tendencia a fibrilar y muestran un incremento de la solubilidad cuando se formulan a pH de 2.4 a 4, por ejemplo, pH de 3 a 3.5.

En un aspecto, se proporciona un derivado del análogo de la amilina humana que muestra estabilidad física. En un aspecto adicional, se proporciona un derivado del análogo de la amilina humana que presenta un incremento de la estabilidad física respecto a la amilina humana.

10 En un aspecto, el aminoácido en la posición 17 es His o Arg. Se ha observado que los derivados de amilina que tienen His o Arg en la posición 17 presentan una reducción de la tendencia a fibrilar y permanecen solubles a pH de 2.4 a 4, a la vez que muestran un perfil farmacocinético prolongado aún mejor y mejores propiedades farmacodinámicas que los derivados de amilina conocidos.

15 En un aspecto, los aminoácidos en la posición 25, 28 y 29 son Pro. En un aspecto, el análogo de la amilina humana comprende 1-10 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones.

En un aspecto, se sustituye el aminoácido en la posición 1 del análogo de la amilina humana por un aminoácido tal como los aminoácidos Glu, Arg e His o se elimina el aminoácido en la posición 1.

En un aspecto, el sustituyente comprende un conector.

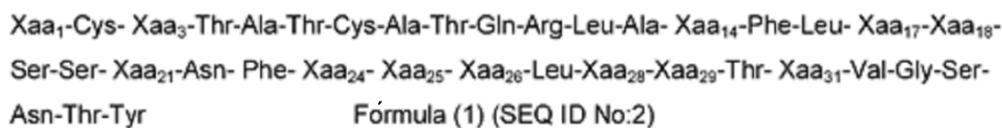
20 En un aspecto, el conector comprende 1-10 aminoácidos que se unen al grupo α-amino del residuo aminoacídico N-terminal o a un residuo de Lys en el análogo de la amilina humana. En un aspecto, los aminoácidos se seleccionan a partir del grupo constituido por γGlu, Arg, γGlu-Arg, γGlu-His, Trx-γGlu, γGlu-His, Glu-Lys, Glu-Glu, Glu-Arg, γGlu-His-His, γGlu-Arg-His, γGlu-His-Arg, γGlu-Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, Glu-Lys-Arg, γGlu-Glu-His-His, γGlu-Glu-His-Arg, Glu-Glu-Arg-Glu y Glu-Glu-Glu-Glu.

25 El conector puede comprender además $-C(O) - (CH_2)_l - O - [CH_2CH_2 - O]_m - (CH_2)_p - [NHC(O) - (CH_2)_n - O - [(CH_2)_n - O]_m - (CH_2)_p]_q - NH -$ donde l, m, n y p son independientemente 1-7, y q es 0-5. Por ejemplo, el conector puede comprender $-C(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - NH - o - C(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - [NHC(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2]_1 - NH -$ y $-C(O) - (CH_2)_2 - O - [CH_2CH_2 - O] - (CH_2)_2 - NH -$. En un aspecto, el conector comprende además γGlu o GABA.

30 En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo seleccionado a partir del grupo que comprende $HOOC(CH_2)_sCO -$, donde s es un número entero de 17 a 21, por ejemplo, 18, 19 o 20.

35 En un aspecto, el conector comprende γGlu, γGlu-His o γGlu-His-His. En un aspecto, el derivado del análogo de la amilina humana tiene His en la posición 1 y 17, el aminoácido en la posición 25, 28 y 29 es Pro, el conector comprende γGlu-His-His o γGlu-His unidos al grupo α-amino de la His en la posición 1 del análogo de la amilina humana y el residuo de unión a la albúmina está unido al γGlu del conector, donde el residuo de unión a la albúmina es $HOOC(CH_2)_{18}CO$ o $HOOC(CH_2)_{16}CO -$.

En un aspecto, la invención trata sobre un derivado de amilina que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula 1:



donde

40 Xaa_1 se elimina o se selecciona independientemente entre Lys, Arg, His y Glu;

Xaa_3 se selecciona independientemente entre Asn y Lys;

Xaa_{14} se selecciona independientemente entre Glu, Asn, Gln y Asp;

Xaa_{17} se selecciona independientemente entre His, Ser, Gly, Arg y Pro;

Xaa_{18} se selecciona independientemente entre His o Arg;

45 Xaa_{21} se selecciona independientemente entre Asp, Asn y Gln;

- Xaa₂₄ se selecciona independientemente entre Glu y Gly;
- Xaa₂₅ se selecciona independientemente entre Ala y Pro;
- Xaa₂₆ se selecciona independientemente entre Pro e Ile;
- Xaa₂₈ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- 5 Xaa₂₉ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- Xaa₃₁ se selecciona independientemente entre Glu y Asn;
- el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- donde un sustituyente se conecta al residuo aminoacídico Xaa₁ o la Cys en la posición 2, comprendiendo dicho sustituyente un resto de unión a la albúmina.
- 10 En un aspecto de la invención, el extremo C del derivado de amilina se puede hacer terminar con un ácido o amida. En un aspecto, el extremo C del derivado de amilina es una amida.
- En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina se une de manera no covalente a la albúmina.
- En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina tiene una afinidad de unión respecto a la albúmina sérica humana que es inferior a aproximadamente 10 μ M o inferior a aproximadamente 1 μ M. Los derivados de la presente invención son capaces de unirse, o si no interactúan de manera directa o indirecta, con un receptor de amilina, u otro receptor o receptores con los que la propia amilina pueda interactuar, para provocar una respuesta biológica, por ejemplo, reducir la ingesta de alimentos.
- 15 En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 14 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, 17, 18, 19, 20 y 21 átomos de carbono.
- 20 En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acetilo seleccionado partir del grupo que comprende CH₃(CH₂)_rCO-, donde r es un número entero de 4 a 38, preferentemente un número entero de 4 a 24, más preferentemente seleccionado a partir del grupo que comprende CH₃(CH₂)₆CO-, CH₃(CH₂)₈CO-, CH₃(CH₂)₁₀CO-, CH₃(CH₂)₁₂CO-, CH₃(CH₂)₁₄CO-, CH₃(CH₂)₁₆CO-, CH₃(CH₂)₁₈CO-, CH₃(CH₂)₂₀CO- y CH₃(CH₂)₂₂CO-.
- En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina comprende un grupo que puede tener carga negativa a pH 7.4.
- 25 En un aspecto, el residuo de unión a la albúmina comprende un grupo de tipo ácido carboxílico, tal como HOOC(CH₂)_sCO-, donde s es un número entero de 12 a 22, por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21 o 22.
- En un aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo de fórmula CH₃(CH₂)_vCO-NHCH(COOH)(CH₂)₂CO-, donde v es un número entero de 10 a 24. En un aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo de fórmula CH₃(CH₂)_wCO-NHCH((CH₂)₂COOH)CO-, donde w es un número entero de 8 a 24.
- 30 En un aspecto, el conector comprende 1-10 aminoácidos. Los aminoácidos se pueden seleccionar a partir del grupo constituido por γ Glu, Arg, γ Glu-Arg, γ Glu-His, Trx- γ Glu, γ Glu-His, Glu-Lys, Glu-Glu, Glu-Arg, γ Glu-His-His, γ Glu-Arg-His, γ Glu-His-Arg, γ Glu-Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, Glu-Lys-Arg, γ Glu-Glu-His-His, γ Glu-Glu-His-Arg, Glu-Glu-Arg-Glu y Glu-Glu-Glu-Glu.
- 35 En un aspecto el conector puede comprender además -C(O) - (CH₂)_l-O-[CH₂CH₂-O]_m-(CH₂)_p-[NHC(O) - (CH₂)_r-O-[(CH₂)_n-O]_m-(CH₂)_q]-NH- donde l, m, n y p son independientemente 1-7, y q es 0-5. El conector se puede, por ejemplo, el conector se puede seleccionar a partir del grupo constituido por -C(O)-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH- o -C(O)-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-[NHC(O)-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂]₁-NH- y -C(O)-(CH₂)₂-O-[CH₂CH₂-O]₇-(CH₂)₂-NH-. En un aspecto, el conector comprende además γ Glu. En un aspecto, el conector comprende GABA.
- 40 En un aspecto, el Xaa₁ es His, Xaa₁₇ es His, Xaa₂₅ es Pro, Xaa₂₈ es Pro, Xaa₂₉ es Pro, el residuo de unión a la albúmina es HOOC(CH₂)₁₈CO y el conector comprende γ Glu-His-His, donde el residuo de unión a la albúmina se une al conector mediante el γ Glu del conector. En un aspecto, el Xaa₁ es His, Xaa₁₇ es His, Xaa₂₅ es Pro, Xaa₂₈ es Pro, Xaa₂₉ es Pro, el residuo de unión a la albúmina es HOOC(CH₂)₁₆CO y el conector comprende γ Glu-His, donde el residuo de unión a la albúmina se une al conector mediante el γ Glu del conector.
- 45 En un aspecto, el derivado se selecciona a partir del grupo constituido por:
- N-alfa-(19-carboxinadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14, His17,Glu31]-pramlintida,
- N-épsilon3-(19-carboxinadecanoil-Glu-Glu-Arg-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,

- N*-épsilon3-{2-[2-(2-((S)-4-carboxi-2-((S)-4-carboxi-2-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino)butirilamino)etoxi)etoxi]acetil]-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,
N-épsilon3-(19-carboxinonadecanoil-Glu-Glu-Glu-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
5 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-Arg-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
10 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ala17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Pro17]-pramlintida (2-37),
15 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-[His17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Gly17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ala17]-pramlintida,
20 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ser17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Pro17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
25 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-Arg-[Ala17]-pramlintida,
N-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida,
30 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
35 *N*-alfa-[4-carboxi-4-({4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]trans-ciclohexanocarbonil}amino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,Arg17]-pramlintida,

- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Arg17]-pramlintida, *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-[His1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,His17]-pramlintida,
- 5 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- 10 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Asp14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Asp14,His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17,Glu24]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Arg1, His17]-pramlintida,
- 15 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Arg17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17, Arg18]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Asp14, His17,Gln21 ,Ala25, Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- 20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[3-(2-{2-[2-(2-{2-[2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino] [Arg1,His17]-pramlintida,
- 25 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17,Asp31]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
- 30 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1 His17,Gln21]-pramlintida,
- 35 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(5-carboxipentanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-GluHis-His-[Arg1,His17,Gln21]-pramlintida,
- 40 *N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida,

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
5 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-His[Arg 1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His1,His17]-pramlintida.

10 En un aspecto, la invención trata sobre una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición es adecuada para la administración parenteral.

En un aspecto, el derivado de acuerdo con la invención se puede utilizar como un medicamento.

15 En un aspecto, el derivado se puede utilizar como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.

En un aspecto, el medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2

20 En un aspecto, el medicamento se puede utilizar para disminuir la ingesta de alimentos, tratar la obesidad, disminuir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β .

En un aspecto, el derivado de acuerdo con la invención se puede utilizar para preparar un medicamento.

En un aspecto, el derivado se puede utilizar para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.

25 En un aspecto, el derivado se puede utilizar para preparar un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

En un aspecto, el derivado se puede utilizar para preparar un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β .

30 El tratamiento con un derivado de acuerdo con la presente invención también se puede combinar con una segunda sustancia farmacológicamente activa o con más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes contra la obesidad, agentes reguladores del apetito, agentes contra la hipertensión, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas con ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o
35 asociados con ella. Son ejemplos de estas sustancias activas desde un punto de vista farmacológico: insulina, derivados de insulina, análogos de insulina, GLP-1, derivados de GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de oxintomodulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasas, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas que participan en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el
40 metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan en el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como
45 benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueantes del canal del calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y bloqueantes α tales como doxazosina, urapidil, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado de cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de
50 CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de β 3, agonistas de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos noradrenérgicos y de serotonina mixtos, agonistas de 5HT (serotonina),

agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tirotrópina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasas/amilasas, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas de TR β ; antagonistas de histamina H3, gastrina y análogos de gastrina.

Se debe entender que cualquier combinación adecuada de los derivados de acuerdo con la invención con uno o más de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales se consideran dentro del alcance de la presente invención.

En un aspecto, un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende el derivado de acuerdo con la invención comprende mezclar un derivado de acuerdo con la invención con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de acuerdo con la invención, el derivado de amilina tiene un perfil farmacocinético prolongado en comparación con la pramlintida según se mide mediante el Ensayo (V) tal como se describe en la sección Ensayos. En un aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 30 horas. En un aspecto de la invención, la $T_{1/2}$ plasmática es de al menos 40 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 50 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 60 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 70 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 75 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 80 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 85 horas. En otro aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 90 horas. En un aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 95 horas. En un aspecto de la invención, el derivado de amilina tiene una $T_{1/2}$ plasmática de al menos 100 horas.

La producción de péptidos tales como la amilina humana o análogos de esta es muy conocida en la técnica. Por lo tanto, los péptidos de la invención se pueden producir mediante la síntesis clásica de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la química de t-Boc o Fmoc u otras técnicas de eficacia comprobada, remítase a, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. Los péptidos también se pueden producir mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido. En el caso de los péptidos que comprenden residuos aminoácidos no naturales, la célula recombinante debería modificarse de manera que los aminoácidos no naturales se incorporen al péptido, por ejemplo, utilizando mutantes de ARNt.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la presente invención. En un aspecto, el péptido está presente en la formulación con una concentración de aproximadamente 0.1 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL. En otro aspecto, el péptido está presente en la formulación con una concentración de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL.

En un aspecto, la formulación tiene un pH de 2.0 a 10.0. En un aspecto, la formulación tiene un pH de 2.0 a 7.0. En un aspecto, la formulación tiene un pH de 2.5-4.5. En un aspecto, la formulación tiene un pH de 2.5-4.0.

Las composiciones farmacéuticas que contiene un derivado de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, tal como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

La formulación puede comprender además un sistema tamponante, uno o más conservantes, uno o más agentes de tonicidad, uno o más agentes quelantes, estabilizantes y/o surfactantes. El experto estará familiarizado con el uso de tales excipientes en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

En un aspecto de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es habitualmente una solución o una suspensión. En un respecto adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión «**formulación acuosa**» se define como una formulación que comprende al menos un 50% p/p de agua. De un modo similar, la expresión «**solución acuosa**» se define como una solución que comprende al menos un 50% p/p de agua y la expresión «**suspensión acuosa**» se define como una suspensión que comprende al menos un 50% p/p de agua.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelación, a la cual el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso. En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, secada por congelación o secada por pulverización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

La expresión «**forma seca**» se refiere a que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca mediante secado por congelación (es decir, liofilización; remítase, por ejemplo, a Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por pulverización (remítase a Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5.^a ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), págs. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), o secado con aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregados por parte de un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de manera adversa la actividad biológica de ese polipéptido, lo que da como resultado una pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene el polipéptido utilizando un sistema de infusión.

En un aspecto adicional de la invención, el tampón se selecciona a partir del grupo constituido por acetato de sodio, citrato, carbonato de sodio, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, ácido láctico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye un aspecto alternativo de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un agente isotónico, por ejemplo, propilenglicol, manitol o glicerol. En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un agente quelante.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un estabilizante. El experto estará familiarizado con el uso de un estabilizante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

Más concretamente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente muestre formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. La expresión «**formación de agregados**» se refiere a una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que da como resultado la formación de oligómeros, que pueden seguir siendo solubles, o agregados grandes visibles que precipitan a partir de la solución. La expresión «**durante el almacenamiento**» se refiere a una composición o formulación farmacéutica líquida que una vez preparada no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, tras la preparación se empaqueta para su almacenamiento, ya sea en una forma líquida, un estado congelado o una forma seca para su reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad de una base de tipo aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por parte del polipéptido durante el almacenamiento de la composición. La expresión «**base de tipo aminoácido**» se refiere a un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido concreto está presente en su forma de base libre o en su forma salina. Cuando se utiliza una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presente en sus formas salinas o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas salinas. En un aspecto, los aminoácidos para su uso en la preparación de las composiciones de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o mezclas de estos) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de estos), o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presente en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma salina. En un aspecto, se utiliza el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos y derivados de estos. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y *N*-monoetil-L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen *S*-metil-L-cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan a las composiciones en su forma de base libre o en su forma salina. En un aspecto adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos y derivados de estos se utilizan en una concentración que es suficiente para prevenir o retrasar la agregación de la proteína.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un surfactante. En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además inhibidores de proteasas. El uso de un inhibidor de proteasas es especialmente útil en las composiciones farmacéuticas que comprenden zimógenos de proteasas con el fin de inhibir la autocatálisis.

Es posible que haya otros ingredientes presentes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes formadores de masa, modificantes de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido

tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, obviamente, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

5 Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de la amilina humana o análogo de esta de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesite un tratamiento de este tipo en varios puntos, por ejemplo, en puntos tópicos, por ejemplo, puntos de mucosas y cutáneos, en puntos en los que no se produzca absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en puntos que conlleven absorción, por ejemplo, la administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

10 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo mediante varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de estos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral y parenteral a pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo.

15 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas balsámicas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, nebulizados, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, deposición *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión e implantes.

20 Además, las composiciones de la invención pueden formar un compuesto con un portador de fármacos, un sistema de suministro de fármacos y un sistema de suministro de fármacos avanzado, o estar unidas a estos, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, con el fin de mejorar adicionalmente la estabilidad del derivado de la amilina humana o un análogo de esta, incrementar la biodisponibilidad, incrementar la solubilidad, reducir los efectos adversos, conseguir la cronoterapia con la cual estarán familiarizados los expertos en la técnica e incrementar la adhesión al tratamiento por parte del paciente o cualquier combinación de estos factores.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar del derivado de la amilina humana o un análogo de esta, utilizando, por ejemplo, un inhalador dosificador, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos ellos dispositivos muy conocidos por los expertos en la técnica.

30 Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sistemas de suministro farmacológico de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta.

35 La administración parenteral se puede llevar a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa utilizando una jeringuilla, opcionalmente, una jeringuilla en forma de bolígrafo. Como alternativa, la administración parenteral se puede llevar a cabo utilizando una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del derivado de la amilina humana o un análogo de esta en forma de un nebulizado nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el derivado de la amilina humana o un análogo de esta de la invención también se pueden adaptar para la administración transdérmica, por ejemplo, mediante una inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente, un parche iontoforético, o para la administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

40 El derivado de la amilina humana o un análogo de esta se puede administrar mediante la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o un polvo seco, utilizando cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para el suministro farmacológico pulmonar. Los ejemplos de estos comprenden, sin carácter limitante, los tres tipos generales de generadores de aerosoles para el suministro farmacológico pulmonar y pueden incluir nebulizadores ultrasónicos o de chorro, inhaladores dosificadores o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. *Crit Rev Ther Drug Carr Sys* 14(4) (1997) 395-453).

En un aspecto de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la amilina humana o un análogo de esta es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

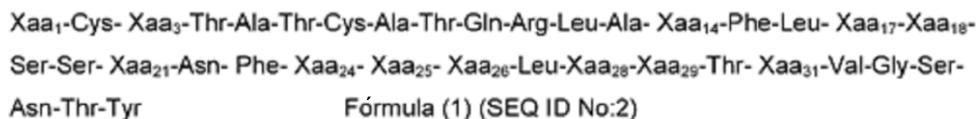
50 En otro aspecto de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la amilina humana o un análogo de esta es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la amilina humana o un análogo de esta es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

55 En otro aspecto adicional más de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de la amilina humana o un análogo de esta es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

La invención se resume en los siguientes párrafos:

- 5 1. Un derivado de amilina, que es un análogo de la amilina humana que tiene un sustituyente unido al grupo α -amino del residuo aminoacídico N-terminal o a un residuo de Lys en el análogo de la amilina humana, donde el sustituyente comprende un resto de unión a la albúmina y el residuo aminoacídico en la posición 17 del análogo de la amilina humana es cualquier aminoácido natural excepto Val, Lys o Ala y donde la numeración de aminoácidos del análogo de la amilina humana corresponde a la numeración de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Un derivado de acuerdo con el párrafo 1, donde el residuo aminoacídico en la posición 17 es His, Ser, Gly, Pro o Arg.
3. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-2, donde los aminoácidos en la posición 25, 28 y 29 son Pro.
4. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-3, donde el análogo de amilina humana comprende 1-10 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones.
5. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-4, donde el aminoácido en la posición 1 del análogo de la amilina humana se sustituye o elimina.
- 15 6. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-5, donde el aminoácido en la posición 1 se selecciona a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg e His.
7. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-6, donde el sustituyente comprende un conector.
8. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-7, donde el conector comprende 1-10 aminoácidos que están unidos al grupo α -amino del residuo aminoacídico N-terminal o a un residuo de Lys en el análogo de la amilina humana.
- 20 9. Un derivado de acuerdo con el párrafo 8, donde los aminoácidos se seleccionan a partir del grupo constituido por γ Glu, Arg, γ Glu-Arg, γ Glu-His, Trx- γ Glu, γ Glu-His, Glu-Lys, Glu-Glu, Glu-Arg, γ Glu-His-His, γ Glu-Arg-His, γ Glu-His-Arg, γ Glu-Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, Glu-Lys-Arg, γ Glu-Glu-His-His, γ Glu-Glu-His-Arg, Glu-Glu-Arg-Glu y Glu-Glu-Glu-Glu.
- 25 10. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-9, donde el conector comprende $-C(O) - (CH_2)_l-O - [CH_2CH_2-O]_m - (CH_2)_p - [NHC(O) - (CH_2)_O - [(CH_2)_n-O]_m - (CH_2)_p]_q - NH-$ donde l, m, n y p son independientemente 1-7, y q es 0-5.
11. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-10, donde el conector se selecciona a partir del grupo constituido por $-C(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - NH-$ o $-C(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - [NHC(O) - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 -]_1 - NH-$ y $-C(O) - (CH_2)_2 - O - [CH_2CH_2-O] - (CH_2)_2 - NH-$.
- 30 12. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-11, donde el conector comprende γ Glu, γ Glu-His o γ Glu-His-His.
13. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-12, donde el conector comprende GABA.
14. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-13, donde el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo seleccionado a partir del grupo que comprende $HOOC(CH_2)_sCO-$, donde s es un número entero de 17 a 21, por ejemplo, 18, 19 o 20.
- 35 15. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1-14, donde el aminoácido en la posición 1 y 17 del análogo de la amilina humana es His, el aminoácido en la posición 25, 28 y 29 es Pro, el conector que comprende γ Glu-His-His o γ Glu-His está unido al grupo α -amino de la His en la posición 1 del análogo de la amilina humana y un residuo de unión a la albúmina está unido al γ Glu del conector, donde el residuo de unión a la albúmina es $HOOC(CH_2)_{18}CO$ o $HOOC(CH_2)_{16}CO-$.
- 40 16. Un derivado de acuerdo con el párrafo 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula 1:



donde

Xaa_1 se elimina o se selecciona independientemente entre Lys, Arg, His y Glu;

Xaa_3 se selecciona independientemente entre Asn y Lys;

45 Xaa_{14} se selecciona independientemente entre Glu, Asn, Gln y Asp;

- Xaa₁₇ se selecciona independientemente entre His, Ser, Gly, Arg y Pro;
- Xaa₁₈ se selecciona independientemente entre His o Arg;
- Xaa₂₁ se selecciona independientemente entre Asp, Asn y Gln;
- Xaa₂₄ se selecciona independientemente entre Glu y Gly;
- 5 Xaa₂₅ se selecciona independientemente entre Ala y Pro;
- Xaa₂₆ se selecciona independientemente entre Pro e Ile;
- Xaa₂₈ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- Xaa₂₉ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- Xaa₃₁ se selecciona independientemente entre Glu y Asn;
- 10 el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- donde un sustituyente se conecta al residuo aminoacídico Xaa₁ o la Cys en la posición 2, comprendiendo dicho sustituyente un resto de unión a la albúmina.
17. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16, donde el residuo de unión a la albúmina se une de manera no covalente a la albúmina.
- 15 18. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16-17, donde el residuo de unión a la albúmina tiene una afinidad de unión respecto a la albúmina sérica humana que es inferior a aproximadamente 10 μM o inferior a aproximadamente 1 μM.
19. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16-18, donde el residuo de unión a la albúmina es un resto lipófilo.
- 20 20. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16-19, donde el residuo de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 14 a 22 átomos de carbono, por ejemplo, 17, 18, 19, 20 y 21 átomos de carbono.
21. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16-20, donde el residuo de unión a la albúmina comprende un grupo que puede tener carga negativa a pH 7.4.
- 25 22. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 y 16-21, donde el residuo de unión a la albúmina comprende un grupo de tipo ácido carboxílico.
23. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1, 16-22, donde el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo seleccionado a partir del grupo que comprende HOOC(CH₂)_sCO-, donde s es un número entero de 12 a 22, por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21 o 22.
- 30 24. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-23, donde el sustituyente comprende un conector.
25. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-24, donde el conector comprende 1-10 aminoácidos.
26. 9. Un derivado de acuerdo con el párrafo 1 y 16-25, donde los aminoácidos se seleccionan a partir del grupo constituido por γGlu, Arg, γGlu-Arg, γGlu-His, Trx-γGlu, γGlu-His, Glu-Lys, Glu-Glu, Glu-Arg, γGlu-His-His, γGlu-Arg-His, γGlu-His-Arg, γGlu-Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, Glu-Lys-Arg, γGlu-Glu-His-His, γGlu-Glu-His-Arg, Glu-Glu-Arg-Glu y Glu-Glu-Glu-Glu.
- 35 27. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-26, donde el conector comprende - C(O)-(CH₂)_l-O-[CH₂CH₂-O]_m-(CH₂)_p-[NHC(O)-(CH₂)_n-O-[(CH₂)_n-O]_m-(CH₂)_p]_q-NH- donde l, m, n y p son independientemente 1-7, y q es 0-5.
28. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-27, donde el conector se selecciona a partir del grupo constituido por - C(O) - CH₂ - O - CH₂- CH₂- O - CH₂- CH₂- NH- o -C(O) - CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-[NHC(O)-CH₂-O-CH₂-CH₂-O]₁-CH₂-CH₂]-₁-NH- y -C(O)-(CH₂)₂-O-[CH₂CH₂-O]₇-(CH₂)₂-NH-.
- 40 29. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-28, donde el conector comprende γGlu-His-His o γGlu-His.
30. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1, 16-26 y 29, donde Xaa₁ es His, Xaa₁₇ es His, Xaa₂₅ es Pro, Xaa₂₈ es Pro, Xaa₂₉ es Pro.

31. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1, 16-26 y 29-30, donde γ Glu-His-His está unido a un residuo de unión a la albúmina mediante el γ Glu del conector y donde el residuo de unión a la albúmina es $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}$.
- 5 32. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1, 16-26 y 29-30, donde γ Glu-His está unido a un residuo de unión a la albúmina mediante el γ Glu del conector y donde el residuo de unión a la albúmina es $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}$.
33. Un derivado de acuerdo con los párrafos 1 y 16-30, donde el conector comprende GABA.
34. Un derivado de acuerdo con el párrafo 1, donde el derivado se selecciona a partir del grupo constituido por:
- N*-alfa-(19-carboxinadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, His17, Glu31]-pramlintida,
- N*-épsilon3-(19-carboxinadecanoil-Glu-Glu-Arg-Glu)-[Lys3, His17, Asp21]-pramlintida,
- 10 *N*-épsilon3-{2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-2-[(S)-4-carboxi-2-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]butirilamino)etoxi]etoxi]acetil}-[Lys3, His17, Asp21]-pramlintida,
- N*-épsilon3-(19-carboxinadecanoil-Glu-Glu-Glu-Glu)-[Lys3, His17, Asp21]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Arg1, His17]-pramlintida,
- 15 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[19-carboxinadecanoil]-Glu-Lys-[Arg1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[19-carboxinadecanoil]-Glu-Lys-Arg-[His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Ser17]-pramlintida (2-37),
- 20 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Ala17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Gly17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Arg17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Pro17]-pramlintida (2-37),
- 25 *N*-alfa-[2-(2-[2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Gly17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ala17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ser17]-pramlintida,
- 30 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Pro17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-[2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetil]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
- 35 *N*-alfa-[2-(2-[2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetil]-Arg-[Ala17]-pramlintida,
- N*-alfa-[4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-[His1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-[His17]-pramlintida,
- 40 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His1, His17]-pramlintida,

- N*-alfa-[4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
- 5 *N*-alfa-[4-carboxi-4-({4-[(19-carboxinadecanoilamino)metil]*trans*-ciclohexanocarbonil)amino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-[His1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His1,Arg17]-pramlintida,
- 10 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-[His1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- 15 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Asp14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- 20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Asp14,His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His17,Glu24]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][Arg1, His17]-pramlintida,
- 25 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Arg17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17, Arg18]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Asp14, His17,Gln21,Ala25, Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1,Arg17]-pramlintida,
- 30 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[3-(2-{2-[2-(2-{2-[2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi}etoxi}etoxi}etoxi)etoxi)etoxi]propionilamino] [Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His17,Asp31]-pramlintida (2-37),
- 35 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
- 40 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida,

- N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1 His17,Gln21]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(5-carboxipentanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
- 5 *N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][His17]-pramlintida (2-37),
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-GluHis-His-[Arg1,His17,Gln21]-pramlintida,
- N*-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][His17]-pramlintida (2-37),
- 10 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(S)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[His 1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1, His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida,
- 15 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida,
- N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His1,His17]-pramlintida.
35. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 36. Una composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 35, la cual es adecuada para la administración parenteral.
37. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para su uso como un medicamento.
- 25 38. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para su uso como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 30 39. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para su uso como un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
40. Un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para su uso como un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β .
- 35 41. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para la preparación de un medicamento.
42. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 40 43. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para la preparación de un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 45 44. El uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 para la preparación de un medicamento para disminuir la ingesta de alimentos, disminuir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β .

45. Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con los párrafos 35-36, que comprende mezclar un derivado de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-34 con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

46. Derivado de amilina de acuerdo con los ejemplos.

5 47. Un derivado de acuerdo con el párrafo 34, donde el derivado es *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramintida.

10 Todas las referencias, incluidas publicaciones, solicitudes de patente y patentes citadas en la presente se incorporan por la presente a modo de referencia en su totalidad y en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que cada referencia se incorpora a modo de referencia y se expusiera en su totalidad en la presente (en la máxima medida permitida por la ley).

En la presente, todos los títulos y subtítulos se utilizan únicamente para su conveniencia y no se debe interpretar que limiten la invención de ningún modo.

15 Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos o del lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en la presente sea meramente para clarificar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. No se debe interpretar que ningún lenguaje de la memoria descriptiva indica que algún elemento no reivindicado es esencial para llevar a la práctica la invención.

La citación e incorporación de documentos de patente en la presente se realiza únicamente para su comodidad y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de patente.

20 Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia en cuestión mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la presente en la medida permitida por la ley pertinente.

Ejemplos

Las secuencias peptídicas SEQ ID NO: 1-35 se prepararon de acuerdo con la síntesis de péptidos mencionada más adelante y los compuestos de los ejemplos 1-72 se prepararon de acuerdo con la síntesis mencionada más adelante.

25 Un método de la síntesis de péptidos fue mediante química con Fmoc en un sintetizador de péptidos Liberty con microondas (CEM Corp., Carolina del Norte). La resina fue Tentagel S RAM con una carga de 0.25 mmol/g. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP utilizando soluciones 0.3 M de aminoácidos en NMP y un exceso molar de 6-8 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron 5 minutos a una temperatura de hasta 70 °C. La desprotección fue con piperidina al 5% en NMP a una temperatura de hasta 70 °C. Los aminoácidos protegidos utilizados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem) disueltos con una concentración de 0.3 M en NMP que contenía HOAt 0.3 M.

30 Otro método de la síntesis de péptidos fue en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 en una escala de 0.25 mmol o 1.0 mmol utilizando los protocolos FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean acoplamientos mediados por HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en NMP, y monitorización por UV de la desprotección del grupo protector Fmoc. La resina inicial utilizada para la síntesis de las amidas de los péptidos fue la resina Rink-Amide. Los derivados de aminoácidos protegidos utilizados fueron Fmoc-aminoácidos estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem) suministrados en cartuchos pesados previamente adecuados para el sintetizador ABI433A.

35 Cuando se deseó una modificación química de una cadena lateral de lisina, se incorporó la lisina como Lys(Mtt) y el aminoácido N-terminal se incorporó en la secuencia como un Boc-aminoácido o, si el aminoácido N-terminal se incorporó como un Fmoc-aminoácido, se eliminó el grupo Fmoc y el extremo N se protegió mediante el tratamiento con 6 equivalentes de carbonato-Boc y 6 equivalentes de DIPEA en NMP durante 30 minutos. La resina se lavó con NMP y DCM y el grupo Mtt se eliminó suspendiendo la resina en hexafluoroisopropanol puro durante 20 minutos seguido por un lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó añadiendo uno o más de los componentes básicos enumerados más adelante mediante los mismos métodos que se utilizaron para la síntesis de péptidos, es decir, mediante uno o más pasos automáticos en el Liberty o el ABI 433 o mediante uno o más pasos de acoplamiento manuales a temperatura ambiente. Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM y se secó, y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2 horas con TFA/TIPS/agua (92.5/5/2.5) seguido por precipitación con 4 volúmenes de éter dietílico. Después de lavar más con éter dietílico y secar, el péptido se redisolvió en agua con una concentración de 1-2 mg/mL, se ajustó el pH hasta aproximadamente 4.5 y se formó el puente disulfuro mediante tratamiento con 1.1 eq. de [Pt(IV)etilenodiamina₂Cl₂]₂Cl₂ durante toda la noche. Como alternativa, se formó el puente disulfuro en la resina mediante el tratamiento con 10 equivalentes de yodo en NMP durante 1 hora. En este caso, se purificó el péptido crudo directamente después de la escisión y precipitación con éter dietílico.

Purificación: El péptido crudo se purificó mediante HPLC semipreparativa en una columna de 20 mm x 250 mm empaquetada con sílice C-18 de 5 μ o 7 μ . Las soluciones peptídicas se bombearon en la columna de HPLC y los péptidos precipitados se disolvieron en 5 mL de ácido acético a 50% en H₂O, se diluyeron hasta 20 mL con H₂O y se inyectaron en la columna que, a continuación, se eluyó con un gradiente de un 40-60 % de CH₃CN con 0.1% de TFA, 10 mL/min, durante 50 min a 40 °C. Se recogieron las fracciones que contenían el péptido. El péptido purificado se liofilizó después de la dilución del eluido con agua.

Para el análisis de las fracciones del HPLC y el producto final se llevó a cabo un análisis por RP-HPLC utilizando detección UV a 214 nm y, por ejemplo, una columna Vydac 218TP54 de 4.6 mm x 250 mm de sílice C-18 de 5 μ (The Separations Group, Hesperia, EE. UU.) y se eluyó con, por ejemplo, 1 mL/min a 42 °C. En la mayoría de las veces se utilizó una de estas cuatro condiciones de elución diferentes:

A1: Equilibración de la columna con un tampón constituido por (NH₄)₂SO₄ 0.1 M, el cual se ajustó hasta pH 2.5 con H₂SO₄ concentrado y elución mediante un gradiente de un 0% a un 60% de CH₃CN en el mismo tampón durante 50 min.

B1: Equilibración de la columna con un 0.1% de TFA / H₂O y elución mediante un gradiente de un 0% CH₃CN / 0.1% de TFA / H₂O a un 60% de CH₃CN / 0.1% de TFA / H₂O durante 50 min.

B6: Equilibración de la columna con un 0.1% de TFA / H₂O y elución mediante un gradiente de un 0% CH₃CN / 0.1% de TFA / H₂O a un 90% de CH₃CN / 0.1% de TFA / H₂O durante 50 min.

Como alternativa, el análisis por RP-HPLC se realizó utilizando detección UV a 214 nm y una columna Symmetry300, 3.6 mm x 150 mm, sílice C-18 de 3.5 μ (Waters) que se eluyó con 1 mL/min a 42 °C.

B4: Equilibración de la columna con un 0.05% de TFA / H₂O y elución mediante un gradiente de un 5% CH₃CN / 0.05% de TFA / H₂O a un 95% de CH₃CN / 0.05% de TFA / H₂O durante 15 min.

La identidad del péptido se confirmó mediante MALDI-MS en un Microflex de Bruker.

Abreviaturas utilizadas:

HBTU: (hexafluorofosfato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio

Fmoc: 9*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

Mtt: 4-metiltrilito

DCM: diclorometano

TIPS: triisopropilsilano

TFA: ácido trifluoroacético

NMP: 1-metilpirrolidin-2-ona

HOAt: 1-hidroxi-7-azabenzotriazol

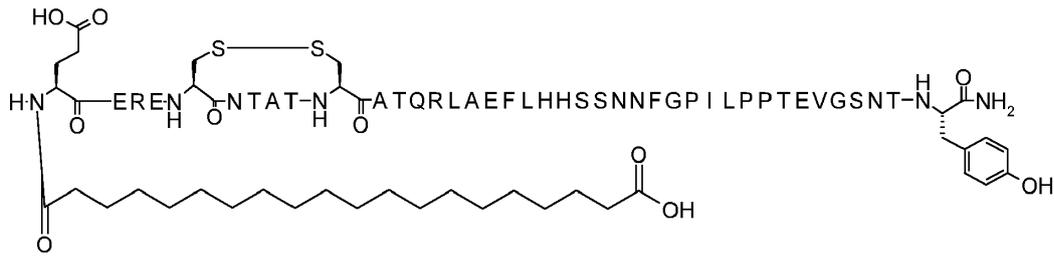
DIC: diisopropilcarbodiimida

Trt: trifenilmetilo

El término «Compuesto X» se refiere al compuesto de acuerdo con el ejemplo X. Por lo tanto, el Compuesto 3 se refiere al compuesto *N*-épsilon3-{2-[2-(2-((*S*)-4-carboxi-2-((*S*)-4-carboxi-2-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]butirilamino)etoxi)etoxi]acetil}-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida.

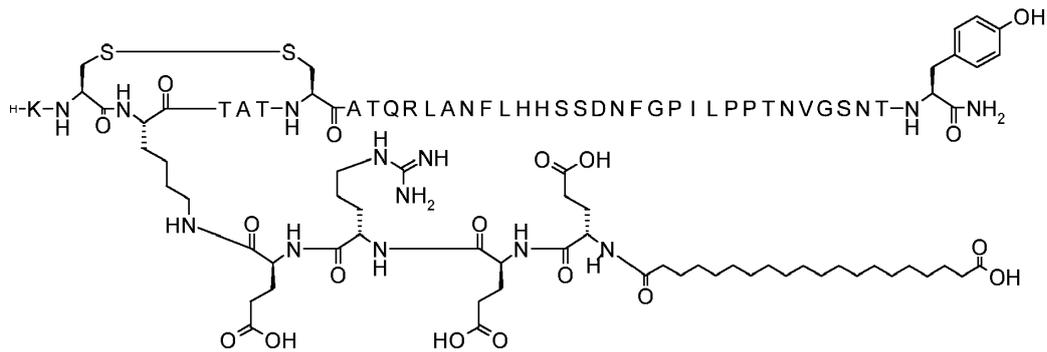
EJEMPLO 1

N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Glu31]-pramlintida



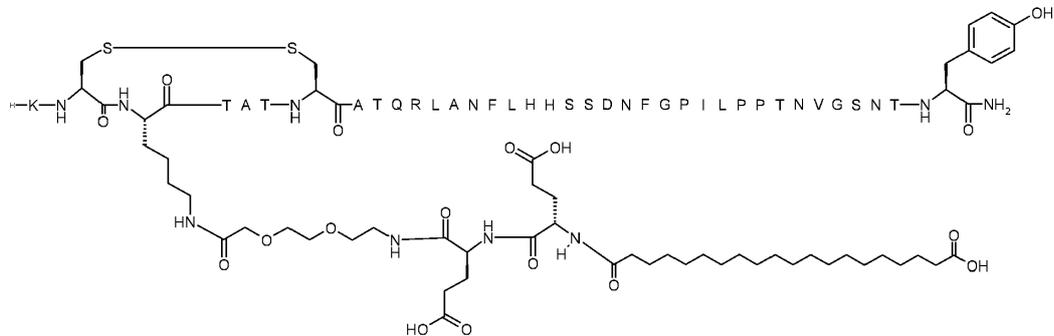
EJEMPLO 2

N-épsilon3-(19-carboxinonadecanoil-Glu-Glu-Arg-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida



5 EJEMPLO 3

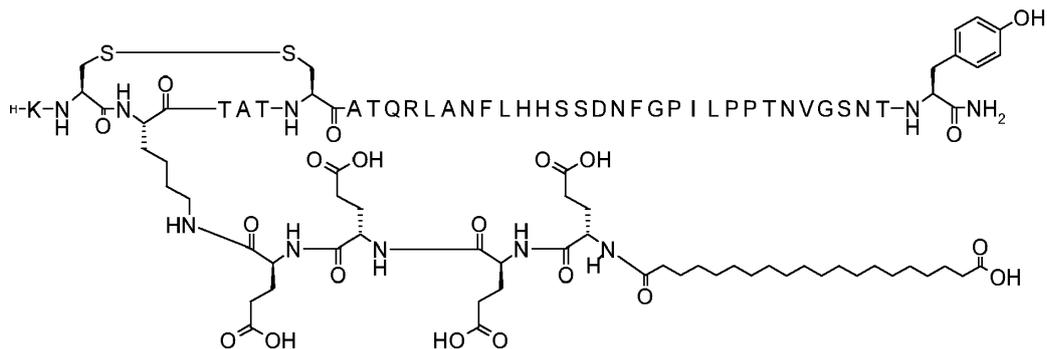
N-épsilon3-{2-[2-(2-((S)-4-carboxi-2-((S)-4-carboxi-2-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino)butirilamino)etoxi)etoxi)acetil]-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida



10 En la figura 1a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 3 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 1b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 4

N-épsilon3-(19-carboxinonadecanoil-Glu-Glu-Glu-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida



EJEMPLO 5

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida



- 5 En la figura 2a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 5 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 2b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 6

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,His17]-pramlintida



- 10 En la figura 3a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 5 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 3b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 7

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida



- 20 En la figura 4a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 7 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 4b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 8

N-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-[Arg1,His17]-pramlintida



- 25 En la figura 5a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 8 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 5b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 9

N-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-Arg-[His17]-pramlintida



- 5 En la figura 6a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 9 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 6b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 10

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37)



- 10 En la figura 7a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 10 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 7b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 11

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser17]-pramlintida (2-37)



- 20 En la figura 8a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 11 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 8b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 12

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ala17]-pramlintida (2-37)



- 25 En la figura 9a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 12 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 9b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 13

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly17]-pramlintida (2-37)



EJEMPLO 14

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17]-pramlintida (2-37)



En la figura 10a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 14 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 10b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

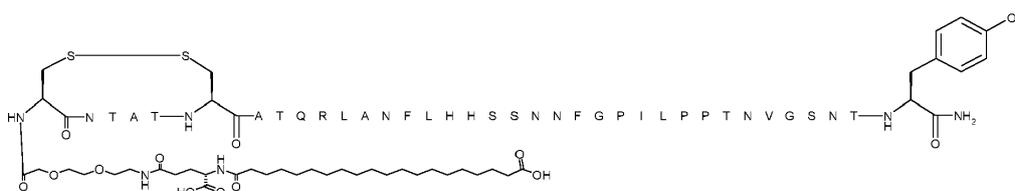
EJEMPLO 15

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Pro17]-pramlintida (2-37)



EJEMPLO 16

15
15 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-[His17]-pramlintida (2-37)



20 En la figura 11a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 16 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 11b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 17

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[His17]-pramlintida



En la figura 12a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 17 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 12b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

5 EJEMPLO 18

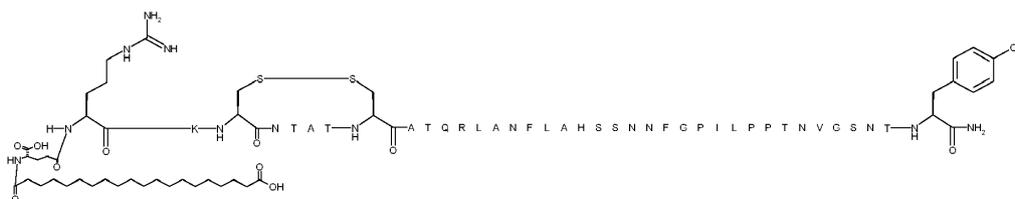
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Gly17]-pramlintida



10 En la figura 13a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 18 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 13b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 19

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ala17]-pramlintida



15 En la figura 14a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 19 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 14b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 20

20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Ser17]-pramlintida



25 En la figura 15a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 20 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 15b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 21

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Pro17]-pramlintida



EJEMPLO 22

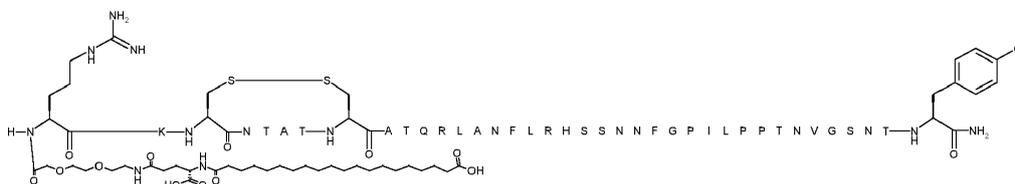
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida



- 5 En la figura 16a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 22 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 16b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 23

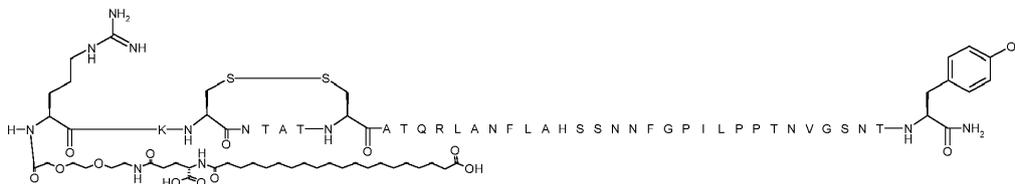
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-Arg-[Arg17]-pramlintida



- 10 En la figura 17a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 23 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 17b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 24

N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-Arg-[Ala17]-pramlintida



- 20 En la figura 18a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 24 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 18b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 25

N-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida

**EJEMPLO 26**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida



EJEMPLO 27

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida



- 5 En la figura 19a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 27 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 19b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 28

- 10 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His17]-pramlintida



- 15 En la figura 20a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 28 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 20b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 29

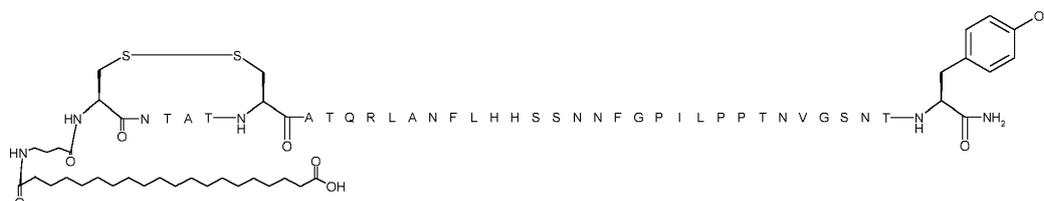
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida



- 20 En la figura 21a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 29 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 21b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, $\alpha = 0.05$.

EJEMPLO 30

N-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37)



25

En la figura 22a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 30 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 22b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

5 **EJEMPLO 31**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida



10 En la figura 23a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 31 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 23b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 32

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida



15 En la figura 24a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 32 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 24b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 33

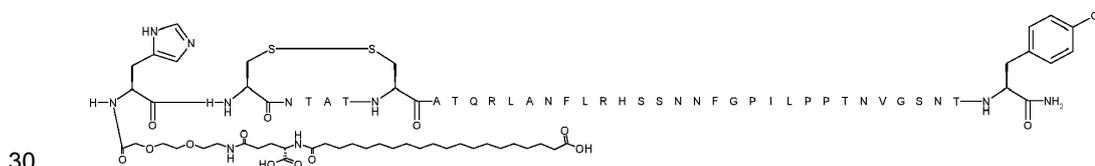
20 *N*-alfa-[4-carboxi-4-({4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]*trans*-ciclohexanocarbonil}amino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida



25 En la figura 25a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 33 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 25b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 34

N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,Arg17]-pramlintida



30 **EJEMPLO 35**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,Arg17]-pramlintida



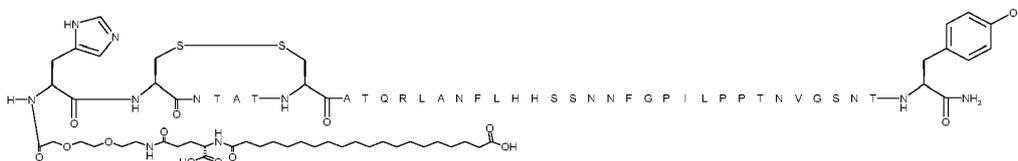
EJEMPLO 36

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Arg17]-pramlintida



5 **EJEMPLO 37**

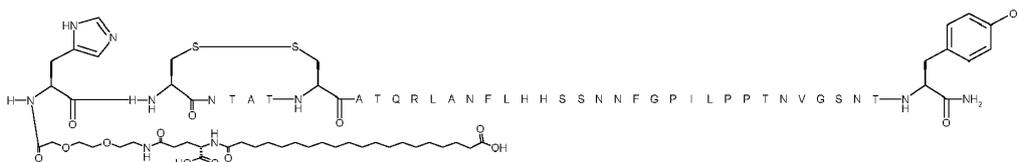
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,His17]-pramlintida



10 En la figura 26a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 37 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 26b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 38

15 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-[His1,His17]-pramlintida



20 En la figura 27a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 38 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 27b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 39

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida



25 En la figura 28a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 39 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 28b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 40

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His17]-pramlintida



5 En la figura 29a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 40 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 29b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 41

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida



10 En la figura 30a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 41 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 30b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

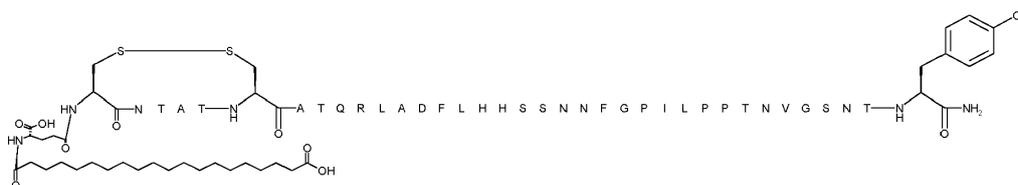
15 **EJEMPLO 42**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Asp14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida



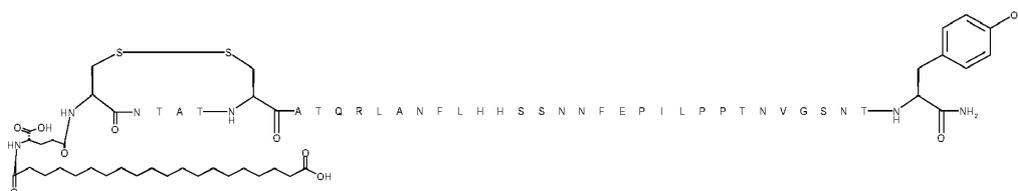
EJEMPLO 43

20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Asp14,His17]-pramlintida (2-37)



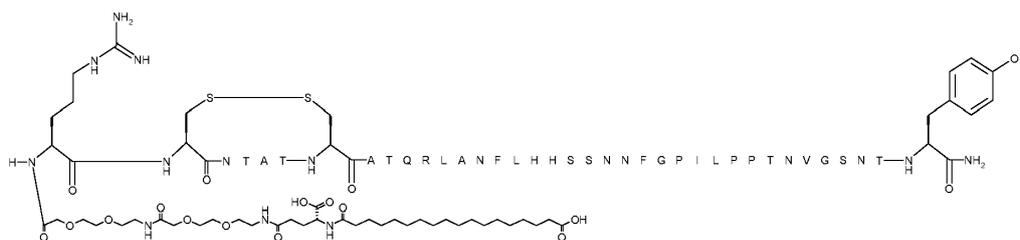
EJEMPLO 44

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17,Glu24]-pramlintida (2-37)



25 **EJEMPLO 45**

N-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil][Arg1, His17]-pramlintida



5 En la figura 31a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 45 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 31b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 46

N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Arg17, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29]-pramlintida



10 **EJEMPLO 47**

N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1, His17, Arg18]-pramlintida



15 En la figura 32a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 47 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 32b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 48

N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Asp14, His17, Gln21, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29]-pramlintida



20 **EJEMPLO 49**

N-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1, Arg17]-pramlintida



EJEMPLO 50

25 *N*-alfa-[(S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu1, His17]-pramlintida



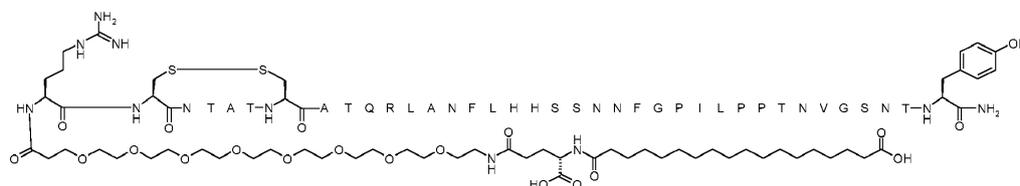
EJEMPLO 51

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,His17]-pramlintida



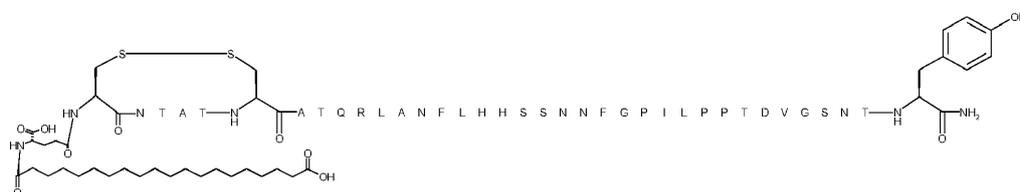
5 EJEMPLO 52

N-alfa-[3-(2-{2-[2-(2-{2-(2-{2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino) [Arg1,His17]-pramlintida



EJEMPLO 53

10 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17,Asp31]-pramlintida (2-37)



EJEMPLO 54

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[His1,His17]-pramlintida



15 En la figura 33a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 54 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 33b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la *t* de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 55

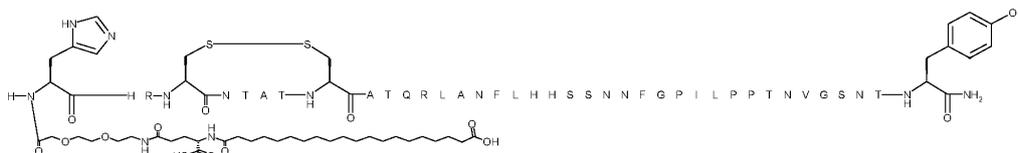
20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[Arg1,His17]-pramlintida



En la figura 34a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 55 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 34b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

5 EJEMPLO 56

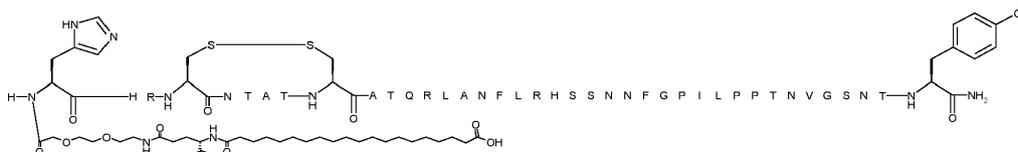
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida



10 En la figura 35a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 56 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 35b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 57

15 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida



20 En la figura 36a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 57 muestra una reducción poco importante de la ingesta de alimentos. La figura 36b muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 58

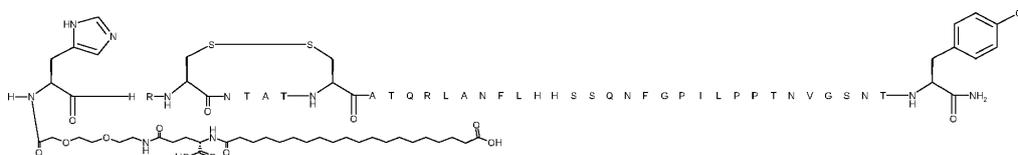
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17]-pramlintida



25 En la figura 37a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 58 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 37b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 59

30 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,His17,Gln21]-pramlintida



En la figura 38a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 59 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 38b, que

muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 60

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida

5



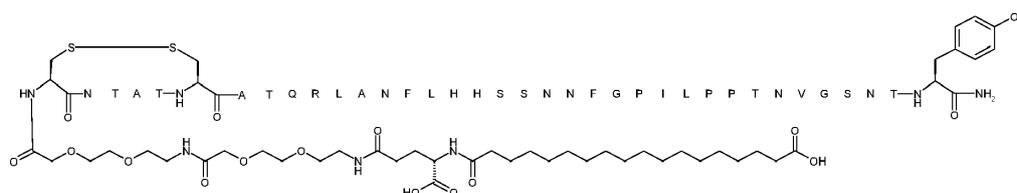
EJEMPLO 61

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(5-carboxipentanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,



EJEMPLO 62

10 *N*-alfa-[2-(2-[2-[2-[2-(2-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil][His17]-pramlintida (2-37)



EJEMPLO 63

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-GluHis-His-[Arg1,His17,Gln21]-pramlintida

15

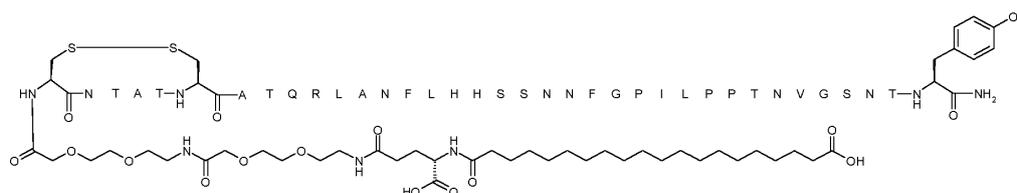


En la figura 39a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 63 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 39b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 64

N-alfa-[2-(2-[2-[2-[2-(2-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil][His17]-pramlintida (2-37)

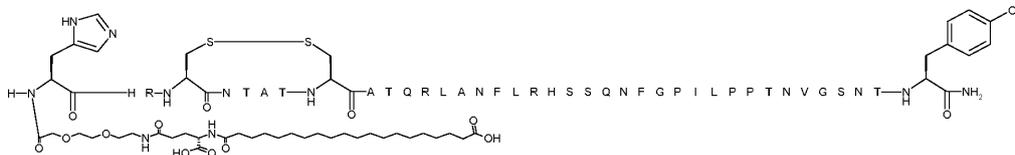
25



En la figura 40a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 64 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 40b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 65

N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetil]-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida

5 **EJEMPLO 66**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-Arg-[His1,His17]-pramlintida



- En la figura 41a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 66 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 41b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 67

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida



- 15 En la figura 42a, que muestra la ingesta de alimentos a lo largo de un periodo de 48 horas, se observa que el compuesto 67 es eficaz para reducir la ingesta de alimentos. Esto también está ilustrado en la figura 42b, que muestra la ingesta de alimentos acumulada en los periodos de 0-24 horas, 24-48 horas y 0-48 horas, respectivamente. Se comparó la ingesta de alimentos utilizando la prueba de la t de Student bilateral, alfa = 0.05.

EJEMPLO 68

- 20 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-His-His-[Arg1,Arg17,Gln21]-pramlintida

**EJEMPLO 69**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-His-[Arg1,His17]-pramlintida



- 25 **EJEMPLO 70**

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-His-[Arg1,His17]-pramlintida



EJEMPLO 71

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[Arg1,His17]-pramlintida



5 EJEMPLO 72

N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His1,His17]-pramlintida



Los derivados de amilina de acuerdo con los ejemplos 1-72 se estudiaron en el «ensayo de la luciferasa» tal como se describe más adelante y los resultados se muestran en la tabla 1 junto con el peso molecular, PM, de los derivados de amilina.

Tabla 1:

Ejemplo	PM	Potencia Luciferasa pmol/L
1	4757.4	900
2	4870.6	900
3	4730.4	400
4	4843.5	2000
5	4312.9	100
6	4469.1	300
7	4441.1	200
8	4597.3	70
9	4725.5	60
10	4284.9	80
11	4262.9	100
12	4246.9	100

ES 2 662 501 T3

	Ejemplo	PM	Potencia Luciferasa pmol/L
	13	4232.8	400
	14	4332.0	200
	15	4279.9	8000
	16	4458.1	100
	17	4597.3	80
	18	4517.2	100
	19	4531.2	100
	20	4547.2	100
	21	4557.3	2000
	22	4616.3	100
	23	4761.5	100
	24	4676.4	80
	25	4572.3	30
	26	4588.3	50
	27	4587.2	100
	28	4578.2	100
	29	4450.1	70
	30	4268.9	60
	31	4559.2	20
	32	4422.0	80
	33	4589.3	100
	34	4751.4	200
	35	4606.3	100
	36	4469.1	100
	37	4595.2	90
	38	4732.4	100

ES 2 662 501 T3

	Ejemplo	PM	Potencia Luciferasa pmol/L
	39	4724.4	60
	40	4734.4	100
	41	4679.2	100
	42	4666.2	600
	43	4313.9	100
	44	4385.0	100
	45	4731.4	30
	46	4684.2	200
	47	4606.3	200
	48	4680.2	60
	49	4590.2	300
	50	4571.2	300
	51	4442.0	200
	52	4864.6	80
	53	4313.9	60
	54	4853.5	100
	55	4891.6	200
	56	4888.6	90
	57	4907.6	300
	58	4891.6	200
	59	4902.6	60
	60	4696.3	50
	61	4528.0	40
	62	4575.2	40
	63	4888.6	100
	64	4603.2	70

ES 2 662 501 T3

	Ejemplo	PM	Potencia Luciferasa pmol/L
	65	4921.6	100
	66	4872.5	100
	67	4872.5	100
	68	4905.6	100
	69	4891.6	100
	70	4762.5	100
	71	4743.4	90
	72	4743.4	50

Se estudió la semivida de los derivados de amilina de la invención en minicerdos y ratas tal como se describe en los ensayos más adelante. Los datos se proporcionan en la tabla 2:

Tabla 2:

	Ejemplo	T½ en minicerdos, horas	T½ en ratas, horas
	5	70	16
	10	66	11
	20	41	10
	22	34	13
	23	53	
	27	64	
	29	110	
	31	41	
	37	66	
	39	60	14
	40	31	
	47	30	
	54	53	
	55	38	

	Ejemplo	T½ en minicerdos, horas	T½ en ratas, horas
	56	31	

ENSAYOS

Ensayo farmacológico (I) - Protocolo experimental para estudiar la eficacia en el apetito con un derivado de amilina, utilizando un modelo en ratas de alimentación sin restricciones.

5 Para los experimentos se utilizaron ratas Sprague Dawley (SD) de Taconic Europe, Dinamarca. Las ratas tienen un peso corporal de 200-250 g al inicio del experimento. Las ratas llegan al menos 10-14 días antes del inicio del experimento para permitir la aclimatación al entorno experimental. Durante este periodo los animales se manipulan al menos 2 veces. Después de la llegada, las ratas se alojan individualmente durante una semana en una fase de luz/oscuridad invertida (lo que quiere decir que las luces están apagadas por el día y encendidas por la noche)

10 durante dos meses. Ya que las ratas están normalmente activas y toman la mayor parte de su ingesta diaria de alimentos durante el periodo de oscuridad, reciben las dosis por la mañana justo antes de que las luces se apaguen. Esta configuración da como resultado la menor variación de los datos y una sensibilidad elevada de la prueba. El experimento se lleva a cabo en las jaulas en las que viven las ratas y estas tienen libre acceso a alimentos y agua a lo largo del periodo de aclimatación y el periodo experimental. Cada dosis del derivado se prueba en un grupo de 5-8 ratas. Se incluye un grupo con vehículo de 6-8 ratas en cada conjunto de prueba. Las ratas reciben dosis una vez según el peso corporal con una solución de 0.01-3 mg/kg administrada por vía intraperitoneal (ip), oral (po) o subcutánea (sc). Para cada grupo se registra el momento de la dosificación. Después de la dosificación, se devuelven las ratas a las jaulas donde viven, donde tienen acceso posteriormente a alimentos y agua. Se registra individualmente el consumo de alimentos de manera continua mediante el registro vía internet o manualmente cada hora durante 7 horas y, después tras 24 h y a veces 48 h. Los animales son sacrificados al final de la sesión experimental.

Los datos individuales se registran en hojas Excel de Microsoft. Los valores atípicos se excluyen después de aplicar la prueba de evaluación estadística de Grubbs para los valores atípicos, y el resultado se presenta gráficamente utilizando el programa GraphPad Prism.

25 Ensayo farmacológico (II) - Protocolo experimental para estudiar la eficacia en el apetito con un derivado de amilina, utilizando un modelo en ratas de alimentación programada.

Para los experimentos se utilizaron ratas TAC:SPRD @mol o ratas Wistar rats del Centro de M&B Breeding and Research Centre A/S, Dinamarca. Las ratas tienen un peso corporal de 200-250 g al inicio del experimento. Las ratas llegan al menos 10-14 días antes del comienzo del experimento con un peso corporal de 180-200 g. Cada dosis del derivado se estudia en un grupo de 6-8 ratas. Se incluye un grupo con vehículo de 6-8 ratas en cada conjunto de prueba.

35 Cuando los animales llegan se alojan individualmente. Al menos 7 días antes del inicio del estudio, empezarán a recibir adiestramiento para el programa de alimentación que les permite tener acceso libre a alimentos y agua en un periodo de tiempo programado entre 3 y 7 h. En el periodo restante del día, las ratas no tendrán acceso a alimentos, tan solo a agua. En una semana, las ratas tomarán la ración diaria completa en la programación fijada. Ya que las ratas normalmente inician la ingesta de alimentos cuando se apaga la luz, y toman la mayor parte de su ingesta de alimentos diaria durante la noche, el resultado de esta configuración es que permite monitorizar la ingesta de alimentos durante el día y normalmente significará que hay una variación menor en el grupo con vehículo en comparación con una rata alimentada sin restricciones. Durante el periodo de aclimatación de 10-14 días, las ratas tienen acceso libre a alimentos y agua. Durante este periodo los animales se manipulan al menos 3 veces. El experimento se lleva a cabo en las jaulas en las que viven las ratas. Justo antes de la dosificación, las ratas se distribuyen aleatoriamente en varios grupos de tratamiento (n = 6-8) según el peso corporal. Reciben las dosis dependiendo del peso corporal entre 15 y 30 min antes de tener acceso a los alimentos con una solución de 0.01-3 mg/kg administrada por vía intraperitoneal (ip), oral (po) o subcutánea (sc). Para cada grupo se registra el momento de la dosificación. Después de la dosificación, se devuelven las ratas a las jaulas donde viven, donde tienen acceso posteriormente a alimentos y agua. El consumo de alimentos se registra individualmente de manera continua mediante el registro vía internet o manualmente cada hora durante el programa. Los animales son sacrificados al final del experimento.

50 Los datos individuales se registran en hojas Excel de Microsoft. Los valores atípicos se excluyen después de aplicar la prueba de evaluación estadística de Grubbs para los valores atípicos, y el resultado se presenta gráficamente utilizando el programa GraphPad Prism.

Ensayo con luciferasa (III)

1. Resumen del ensayo con amilina

Se ha publicado previamente (Poyner DR *et al.* 2002, *Pharmacological Reviews* 54(2) 233-246) que la activación de los receptores de la amilina (coexpresión del receptor de calcitonina y péptidos RAMP que modifican la actividad del receptor) por la amilina conlleva un aumento en la concentración intracelular de cAMP. En consecuencia, se activa la transcripción en promotores que contienen múltiples copias del elemento de respuesta a cAMP (CRE, por sus siglas en inglés) Por lo tanto, es posible medir la actividad de la amilina mediante el uso de un gen indicador CRE luciferasa introducido en células BHK que también expresan un receptor de amilina.

2. Construcción de una línea celular Amilina 3(a)/CRE-luc

Una línea celular BHK570 transfectada de manera estable con el receptor de calcitonina humano (CTa) y un gen indicador CRE-sensible a luciferasa. La línea celular se transfectó adicionalmente con RAMP-3 utilizando métodos estándar. Esto convierte el receptor de calcitonina en un receptor de amilina 3(a). Metotrexato, neomicina e higromicina son marcadores de selección para la luciferasa, receptor de calcitonina y RAMP-3, respectivamente.

3. Ensayo con amilina luciferasa

Para realizar los ensayos de actividad, se sembraron células BHK amilina 3(a)/CRE-luc en placas de cultivo de 96 pocillos con una densidad de aproximadamente 20 000 células/pocillo. Las células estuvieron en 100 µL de medio de cultivo (DMEM con un 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, Na-piruvato 1 mM, metotrexato 250 nM, 500 µg/mL de neomicina y 400 µg/mL de higromicina). Después de la incubación durante toda la noche a 37 °C y un 5% de CO₂, se reemplazó el medio de crecimiento por 50 µL/pocillo de medio de ensayo (DMEM (sin rojo fenol), Glumamax™, 10% de FBS, y HEPES 10 mM, pH 7.4). Además, se añadieron 50 µL/pocillo de patrón o muestra en tampón de ensayo. Después de 4 horas de incubación a 37 °C y un 5% de CO₂, se eliminó el medio de ensayo con patrón o muestra y se reemplazó por 100 µL/pocillo de PBS. Además, se añadieron 100 µL/pocillo de LucLite™. Las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se midió la luminiscencia en un contador de sobremesa (Packard) en modo SPC (recuento de fotón único).

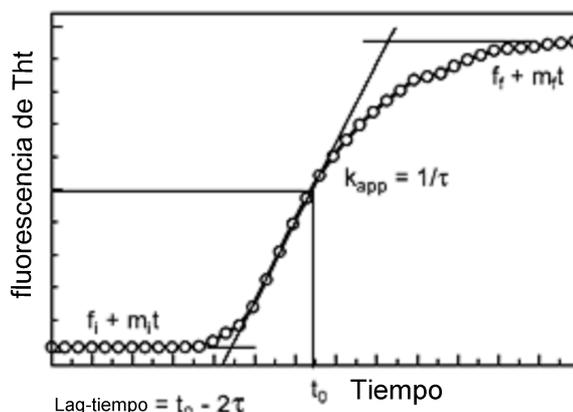
Ensayo (IV) Introducción general a los ensayos de fibrilación de ThT para la evaluación de la estabilidad física de formulaciones proteicas

La baja estabilidad física de un péptido puede conllevar la formación de fibrillas amiloides, que se observa como estructuras macromoleculares bien ordenadas con aspecto de hilo en la muestra que dan como resultado en última instancia la formación de un gel. Esto se ha medido tradicionalmente mediante la inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medida es muy subjetiva y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda que es una molécula indicadora de bajo peso molecular es mucho más conveniente. La tioflavina T (ThT) es una sonda de este tipo y tiene una señal fluorescente característica cuando se une a las fibrillas [Naiki *et al.* (1989) *Anal. Biochem.* 177, 244-249; LeVine (1999) *Methods. Enzymol.* 309, 274-284].

La evolución temporal de la formación de fibrillas se puede describir mediante una curva sigmoidea con la siguiente expresión [Nielsen *et al.* (2001) *Biochemistry* 40, 6036-6046]:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-((t-t_0)/\tau)}} \quad \text{Eq. (1)}$$

En ella, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante t₀ es el tiempo que se necesita para alcanzar el 50% de la fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de fibrillas son el tiempo lag calculado mediante t₀ - 2τ y la constante de velocidad aparente k_{ap} = 1/τ.



Se sugiere la formación de un intermedio parcialmente plegado del péptido como un mecanismo iniciador general para la fibrilación. Pocos de estos intermedios experimentan un proceso de nucleación para formar un molde sobre el cual se pueden ensamblar más intermedios y avanzar la fibrilación. El tiempo lag corresponde el intervalo en el

cual la masa crítica del núcleo se acumula y la constante de velocidad aparente es la velocidad a la cual se forma la propia fibrilla.

Preparación de la muestra

5 Las muestras se prepararon justo antes de cada ensayo. En cada ejemplo se describe cada composición de la muestra. Se ajustó el pH de la muestra al valor deseado utilizando cantidades apropiadas de NaOH y HClO₄ o HCl concentrados. Se añadió tioflavina T a las muestras a partir de una solución madre en H₂O hasta una concentración final de 1 μM.

10 Se colocaron alícuotas de las muestras de 200 μL en una placa de microvaloración de 96 pocillos (Packard Opti-Plate™-96, poliestireno blanco). Normalmente se colocaron cuatro u ocho réplicas de cada muestra (correspondientes a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medida de la fluorescencia

15 La incubación a una temperatura concreta, agitación y medida de la emisión de fluorescencia de ThT se realizaron en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL o un lector de placas Varioskan (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La agitación orbital se ajustó a 960 rpm con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medida de la fluorescencia se realizó utilizando excitación a través de un filtro de 444 nm y medida de la emisión a través un filtro de 485 nm.

20 Cada ciclo se inició incubando la placa a la temperatura de ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos durante un periodo de tiempo deseado. Entre cada medida, la placa se agitó y calentó tal como se ha descrito.

Tratamiento de los datos

25 Se guardaron los puntos de las medidas en un formato de Microsoft Excel para un procesamiento posterior y el trazado y ajuste de la curva se realizó utilizando GraphPad Prism. La emisión de fondo de ThT en ausencia de fibrillas fue despreciable. Los puntos de los datos son normalmente una media de cuatro u ocho muestras y se muestran con barras de desviación estándar. Únicamente se presentan en el mismo gráfico los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir, muestras en la misma placa) lo que garantiza una medida relativa de la fibrilación entre experimentos.

30 El conjunto de datos se puede ajustar a la Ec. (1). Sin embargo, ya que en este caso no siempre se consiguen curvas completamente sigmoideas durante el tiempo de medida, el grado de fibrilación se expresa como fluorescencia de ThT tabulada como la media de las muestras y se muestra con la desviación estándar en varios puntos temporales.

ENSAYO (V) PK - DETERMINACIÓN DE T_{1/2} EN MINICERDOS

35 La T_{1/2} es la semivida terminal = ln2/λ_z de un compuesto en el plasma. λ_z es la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (log-lineal) de la curva de concentración plasmática-tiempo y se estima mediante la regresión lineal del tiempo frente a log. de la concentración.

Los valores de T_{1/2} para los análogos de amilina de la invención se determinan mediante estudios farmacocinéticos en minicerdos Göttingen macho de Ellegaard Göttingen Minipigs ApS y se siguen los principios referentes al cuidado de animales de laboratorio.

40 Se permitió un periodo de aclimatación de aproximadamente 6-10 semanas antes de que los animales entraran en el estudio. Al comienzo del periodo de aclimatación, los minicerdos tuvieron aproximadamente de 5 a 12 meses de edad y un peso en el intervalo de 7-35 kg. A los minicerdos se les insertaron dos catéteres venosos centrales que se utilizaron para la obtención de muestras de sangre.

Los estudios se llevaron a cabo en una habitación para animales que se iluminó para tener ciclos de aprox. 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se alojaron individualmente.

45 Los animales tuvieron acceso libre a agua de bebida de calidad doméstica durante el estudio, pero normalmente se mantuvieron en ayunas desde la noche anterior a la dosificación hasta aprox. 6-12 horas después de la dosificación. Los animales se pesaron a la llegada y el día de la dosificación.

50 En los presentes estudios, las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea en dosis de aprox. 2 nmol/kg. Los animales recibieron una única inyección subcutánea. La inyección subcutánea se administró en el lado derecho del cuello, aproximadamente a 5-7 cm de la oreja y a 7-9 cm del centro del cuello. Las inyecciones se administraron con un tope en la aguja, que permitió que se introdujeran 0.5 cm de la aguja. Cada sustancia se administró normalmente a tres, pero en algunos casos a dos o cuatro, animales.

Se obtuvieron perfiles completos de concentración plasmática-tiempo, empleando 12-16 puntos de muestreo, para cada animal. En el ejemplo, las muestras de sangre se recogieron de acuerdo con la siguiente programación:

Después de la administración subcutánea:

5 Predosis (0), 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 240 horas tras la inyección. En algunos casos, también se tomaron muestras de sangre adicionales hasta 288 horas después de la inyección.

En cada momento de muestreo, se extrajeron de 0.5 a 2 mL de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se tomaron mediante el catéter venoso central.

10 Las muestras de sangre se recogieron en tubos de prueba con EDTA (es decir, microtubo 1.3 mL K3E de Sarstedt). Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo durante 20 min. como máximo antes de la centrifugación. Se separó el plasma utilizando centrifugación (es decir, a 4 °C, 10 min., 1500 G) y se transfirió inmediatamente a tubos Micronic. Se transfirieron aproximadamente 200 µL de plasma a cada tubo Micronic. El plasma se almacenó a -20 °C hasta que se sometió a ensayo. Las muestras de plasma se sometieron a ensayo para determinar el contenido de amilina utilizando un ensayo ELISA.

15 Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimentalizado (NCA, por sus siglas en inglés) utilizando WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE. UU.). Se llevó a cabo NCA utilizando los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo para cada animal. La $T_{1/2}$ es la semivida terminal = $\ln 2/\lambda_z$ y se determinó a partir de λ_z , la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (log-lineal) de la curva, estimada mediante la regresión lineal del tiempo frente a log. de la concentración.

20 **Ensayo plasmático ELISA para la cuantificación de amilina**

25 El ELISA con amilina humana es un inmunoensayo sándwich con anticuerpos monoclonales para determinar los niveles de amilina en el plasma humano. El anticuerpo de captura reconoce la amilina humana, el ácido de amilina (amilina desamidada), un fragmento 1-20 de la amilina, pero no amilina reducida. El anticuerpo de detección se une a la amilina humana reducida o no reducida pero no al ácido de amilina y forma un complejo con la estreptavidina-fosfatasa alcalina. El sustrato, 4-metilumbeliferilfosfato, se aplica al sándwich completado y la señal fluorescente, monitorizada a 355 nm/460 nM, es proporcional a la cantidad de amilina presente en la muestra.

ENSAYO (VI) PK - DETERMINACIÓN DE $T_{1/2}$ EN RATAS

30 La $T_{1/2}$ es la semivida terminal = $\ln 2/\lambda_z$ de un compuesto en el plasma. λ_z es la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (log-lineal) de la curva de concentración plasmática-tiempo y se estima mediante la regresión lineal del tiempo frente a log. de la concentración.

Los valores de $T_{1/2}$ para los análogos de amilina de la invención se determina mediante estudios farmacocinéticos en ratas macho Sprague Dawley de Taconic Europa y se siguen los principios referentes al cuidado de animales de laboratorio.

35 Se permitió un periodo de aclimatación de aproximadamente 7 días antes de que los animales entraran en el estudio. Al comienzo del periodo de aclimatación, las ratas tuvieron un peso en el intervalo de 300-400 g. A las ratas se les insertaron catéteres permanentes en la arteria carótida que se utilizaron para la obtención de muestras de sangre.

40 Los estudios se llevaron a cabo en una habitación para animales que se iluminó para tener ciclos de aprox. 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se alojaron individualmente debido a los catéteres y tuvieron agua y alimentos sin restricciones. Los animales se pesaron los días de la dosificación.

En los presentes estudios, las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea en dosis de aprox. 20 nmol/kg. Los animales recibieron una única inyección subcutánea al cuello utilizando una aguja 25G con jeringuilla. Cada sustancia se administró normalmente a tres, pero en algunos casos a dos o cuatro, animales.

45 Se obtuvieron perfiles completos de concentración plasmática-tiempo, empleando 8-10 puntos de muestreo, para cada animal. En el ejemplo, las muestras de sangre se recogieron de acuerdo con la siguiente programación:

Después de la administración subcutánea:

Predosis (0), 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas tras la inyección. En cada momento de muestreo, se extrajeron de 0.08 a 0,10 mL de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se tomaron mediante el catéter.

50 Las muestras de sangre se recogieron en tubos de prueba con EDTA. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo durante 20 min. como máximo antes de la centrifugación. Se separó el plasma utilizando centrifugación (es decir, a 4 °C, 10 min., 1500 G) y se transfirió inmediatamente a tubos Micronic o placas de PCR. Se transfirieron

aproximadamente 40 µL de plasma y se almacenaron a -20 °C hasta que se sometieron a ensayo. Las muestras de plasma se sometieron a ensayo para determinar el contenido de amilina utilizando un ensayo ELISA.

- 5 Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimentalizado (NCA, por sus siglas en inglés) utilizando WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE. UU.). Se llevó a cabo NCA utilizando los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo para cada animal. La $T_{1/2}$ es la semivida terminal = $\ln 2/\lambda_z$ y se determinó a partir de λ_z , la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (log-lineal) de la curva, estimada mediante la regresión lineal del tiempo frente a log. de la concentración.

Ensayo plasmático ELISA para la cuantificación de amilina

- 10 El ELISA con amilina humana es un inmunoensayo sándwich con anticuerpos monoclonales para determinar los niveles de amilina en el plasma humano. El anticuerpo de captura reconoce la amilina humana, el ácido de amilina (amilina desamidada), un fragmento 1-20 de la amilina, pero no amilina reducida. El anticuerpo de detección se une a la amilina humana reducida o no reducida pero no al ácido de amilina y forma un complejo con la estreptavidina-fosfatasa alcalina. El sustrato, 4-metilumbeliferilfosfato, se aplica al sándwich completado y la señal fluorescente, monitorizada a 355 nm/460 nM, es proporcional a la cantidad de amilina presente en la muestra.
- 15

ENSAYO (VII) - DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD

- 20 Se midieron las curvas de solubilidad frente al pH de la siguiente manera. Se preparó una formulación y se ajustaron las alícuotas a los valores de pH en el intervalo deseado añadiendo HClO₄ o HCl y NaOH. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 2-3 días para que se equilibraran. A continuación, se centrifugaron las muestras. Se retiró una pequeña alícuota de cada muestra para el análisis de HPLC inversa con el fin de determinar la concentración de las proteínas en solución. Se midió el pH de cada muestra después de la centrifugación, y se representó la concentración de cada proteína frente al pH medido.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Novo Nordisk A/S
 <120> Derivados de amilina
 <130> 7860.205-EP
 5 <160> 35
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 < 211> 37
 < 212> PRT
 10 < 213> HUMAN A
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Cys | Asn | Thr | Ala | Thr | Cys | Ala | Thr | Gln | Arg | Leu | Ala | Asn | Phe | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | His | Ser | Ser | Asn | Asn | Phe | Gly | Ala | Ile | Leu | Ser | Ser | Thr | Asn | Val |
| | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
-
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Asn | Thr | Tyr |
| | | 35 | | |
- <210> 2
 < 211> 37
 15 < 212> PRT
 < 213> ARTIFICIAL
 <220>
 < 223> péptido
 < 220> 25
 20 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (1)..(1)
 < 223> Xaa1 se elimina o se selecciona independientemente entre Lys, Arg, His y Glu
 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 25 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa3 se selecciona independientemente entre Asn y Lys
 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (14)..(14)
 30 < 223> Xaa14 se selecciona independientemente entre Glu, Asn, Gln y Asp
 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC

- 222 (17)
< 223> Xaa17 se selecciona independientemente entre His, Ser, Gly, Arg y Pro
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
- 5 < 222> (18)..(18)
< 223> Xaa18 se selecciona independientemente entre His o Arg
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (21) .. (21)
- 10 < 223> Xaa21 se selecciona independientemente entre Asp, Asn y Gln
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (24) .. (24)
< 223> Xaa24 se selecciona independientemente entre Glu y Gly
- 15 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (25) .. (25)
< 223> Xaa25 se selecciona independientemente entre Ala y Pro
<220>
- 20 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (26) .. (26)
< 223> Xaa26 se selecciona independientemente entre Pro e Ile
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
- 25 < 222> (28) .. (28)
< 223> Xaa28 se selecciona independientemente entre Ser y Pro
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (29) .. (29)
- 30 < 223> Xaa29 se selecciona independientemente entre Ser y Pro
<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (31)..(31)
< 223> Xaa31 se selecciona independientemente entre Glu y Asn
- 35 <400> 2

ES 2 662 501 T3

Xaa Cys Xaa Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Xaa Phe Leu
 1 5 10 15

Xaa Xaa Ser Ser Xaa Asn Phe Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 3

< 211> 36

< 212> PRT

5 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 3

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu His
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

10

<210> 4

< 211> 36

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

15 <220>

< 223> péptido

<400> 4

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Ala
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 5

20 < 211> 36

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 662 501 T3

< 223> péptido

<400> 5

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Gly
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 6

5 < 211> 36

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

10 <400> 6

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu His
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Glu Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 7

< 211> 36

< 212> **PRT**

15 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 7

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu His
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asp Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

20 <210> 8

< 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

ES 2 662 501 T3

<220>

< 223> péptido

<400> 8

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Ser His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

5 <210> 9

< 211> 36

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

10 < 223> péptido

<400> 9

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu His
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 10

< 211> 36

15 < 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 10

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu His
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

20 <210> 11

< 211> 36

< 212> PRT

ES 2 662 501 T3

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 11

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Pro
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

5

<210> 12

< 211> 36

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

10

<220>

< 223> péptido

<400> 12

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 13

15

< 211> 36

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

20

<400> 13

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Ser
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 14

< 211> 37

ES 2 662 501 T3

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

5 <400> 14

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Pro Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 15

< 211> 37

< 212> PRT

10 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 15

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asp Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Gln Asn Phe Gly Ala Pro Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

15 <210> 16

< 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

20 < 223> péptido

<400> 16

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Glu Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Glu Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 17

< 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

<220>

5 < 223> péptido

<400> 17

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 18

10 < 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

15 <400> 18

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Gln Asn Phe Gly Ala Pro Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 19

< 211> 37

< 212> **PRT**

20 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 19

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Pro Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

25 <210> 20

ES 2 662 501 T3

< 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

<220>

5 < 223> péptido

<400> 20

Glu Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 21

10 < 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

15 <400> 21

His Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 22

< 211> 37

< 212> **PRT**

20 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 22

ES 2 662 501 T3

His Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

His Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 23

< 211> 37

< 212> PRT

5 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 23

His Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

10

<210> 24

< 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

15

<220>

< 223> péptido

<400> 24

Lys Cys Lys Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

His His Ser Ser Asp Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 25

20

< 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

25

<400> 25

ES 2 662 501 T3

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ala His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 26

< 211> 37

< 212> PRT

5 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 26

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Gly His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

10 <210> 27

< 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

15 < 223> péptido

<400> 27

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 28

< 211> 37

20 < 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

ES 2 662 501 T3

<400> 28

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 29

< 211> 37

5 < 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 29

Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Ala His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

10

<210> 30

< 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

15 <220>

< 223> péptido

<400> 30

Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 31

20 < 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 662 501 T3

< 223> péptido

<400> 31

Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

His His Ser Ser Gln Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 32

5 < 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

10 <400> 32

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Pro His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 33

< 211> 37

< 212> **PRT**

15 < 213> ARTIFICIAL

<220>

< 223> péptido

<400> 33

Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Arg His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

20 <210> 34

< 211> 37

< 212> PRT

< 213> ARTIFICIAL

ES 2 662 501 T3

<220>

< 223> péptido

<400> 34

Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Arg His Ser Ser Gln Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

5 <210> 35

< 211> 37

< 212> **PRT**

< 213> ARTIFICIAL

<220>

10 < 223> péptido

<400> 35

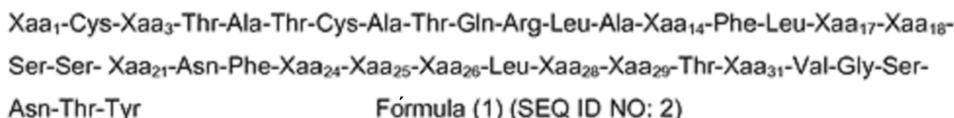
Arg Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Ser His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de amilina que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula 1:

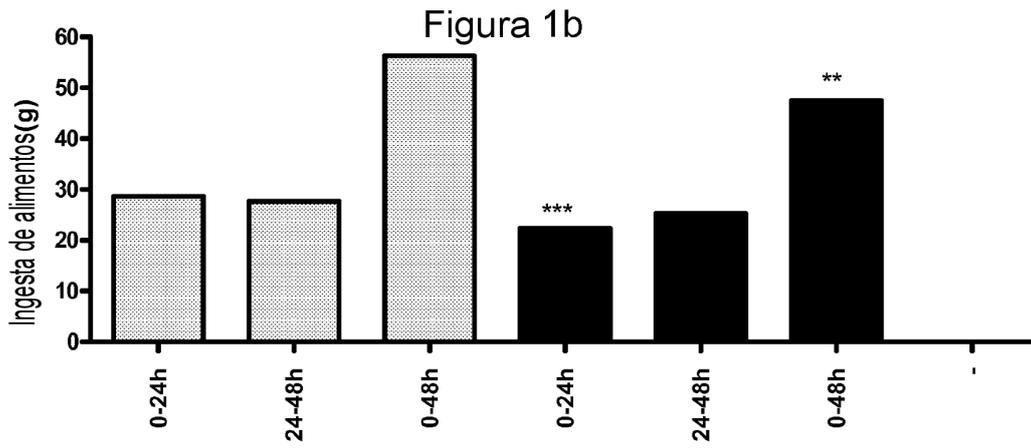
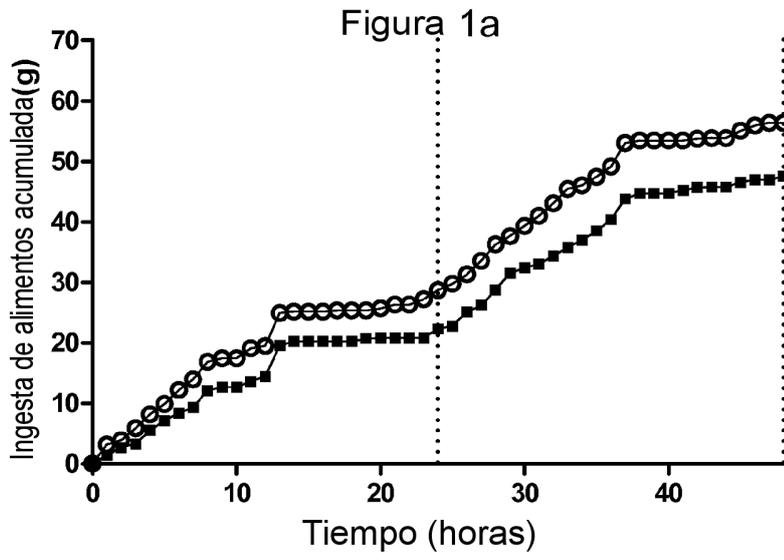


donde

- 5 Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente entre Lys, Arg, His y Glu;
Xaa₃ se selecciona independientemente entre Asn y Lys;
Xaa₁₄ se selecciona independientemente entre Glu, Asn, Gln y Asp;
Xaa₁₇ se selecciona independientemente entre His o Arg;
Xaa₁₈ se selecciona independientemente entre His o Arg;
- 10 Xaa₂₁ se selecciona independientemente entre Asp, Asn y Gln;
Xaa₂₄ se selecciona independientemente entre Glu y Gly;
Xaa₂₅ se selecciona independientemente entre Ala y Pro;
Xaa₂₆ se selecciona independientemente entre Pro e Ile;
Xaa₂₈ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
- 15 Xaa₂₉ se selecciona independientemente entre Ser y Pro;
Xaa₃₁ se selecciona independientemente entre Glu y Asn;
el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
donde un sustituyente se conecta al residuo aminoácido Xaa₁ o la Cys en la posición 2, comprendiendo dicho sustituyente un resto de unión a la albúmina.
- 20 2. Un derivado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el resto de unión a la albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 14 a 22 átomos de carbono;
3. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el resto de unión a la albúmina comprende un grupo de tipo ácido carboxílico.
- 25 4. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 1-3, donde el resto de unión a la albúmina es un grupo acilo seleccionado a partir del grupo que comprende HOOC(CH₂)_sCO-, donde s es un número entero de 12 a 22, por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21 o 22.
5. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el sustituyente comprende un conector.
6. El derivado de acuerdo con la reivindicación 5, donde el conector comprende 1-10 aminoácidos.
- 30 7. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde el conector comprende γGlu, Arg, γGlu-Arg, γGlu-His, Trx-γGlu, γGlu-His, Glu-Lys, Glu-Glu, Glu-Arg, γGlu-His-His, γGlu-Arg-His, γGlu-His-Arg, γGlu-Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, Glu-Lys-Arg, γGlu-Glu-His-His, γGlu-Glu-His-Arg, Glu-Glu-Arg-Glu o Glu-Glu-Glu-Glu.
8. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde el conector comprende γGlu-His-His o γGlu-His.
- 35 9. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, seleccionado a partir del grupo constituido por
N-alfa-(19-carboxinadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Glu31]-pramlintida,
N-épsilon3-(19-carboxinadecanoil-Glu-Glu-Arg-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,
N-épsilon3-{2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-2-[(S)-4-carboxi-2-(19-carboxinadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,

- N*-épsilon3-(19-carboxinonadecanoil-Glu-Glu-Glu-Glu)-[Lys3,His17,Asp21]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida(2-37),
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida,
5 *N*-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-[Arg1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[19-carboxinonadecanoil]-Glu-Lys-Arg-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17]-pramlintida (2-37),
10 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-[His17]-pramlintida
(2-37),
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-Arg-[Arg17]-
pramlintida,
15 *N*-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Arg-[Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
20 *N*-alfa-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17]-pramlintida (2-37),
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[4-carboxi-4-({4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]*trans*-ciclohexanocarbonil}amino)butiril]-[His1,His17]-
pramlintida,
25 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-His-[His1,Arg17]-
pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1,Arg17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Arg17]-pramlintida,
30 *N*-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-His-[His1,His17]-
pramlintida,
N-alfa-[2-(2-{2-[4-(*S*)-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetil]-His-[His1,His17]-
pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,His17]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-Arg-[His17]-pramlintida,
35 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-
[Glu1,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-
[Glu1,Asp14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida,
N-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Asp14,His17]-pramlintida (2-37),
40 *N*-alfa-[(*S*)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His17,Glu24]-pramlintida (2-37),

12. Un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso como un medicamento.
13. Uso de un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la preparación de un medicamento.
- 5 14. El derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.
- 10 15. Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende mezclar un derivado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.



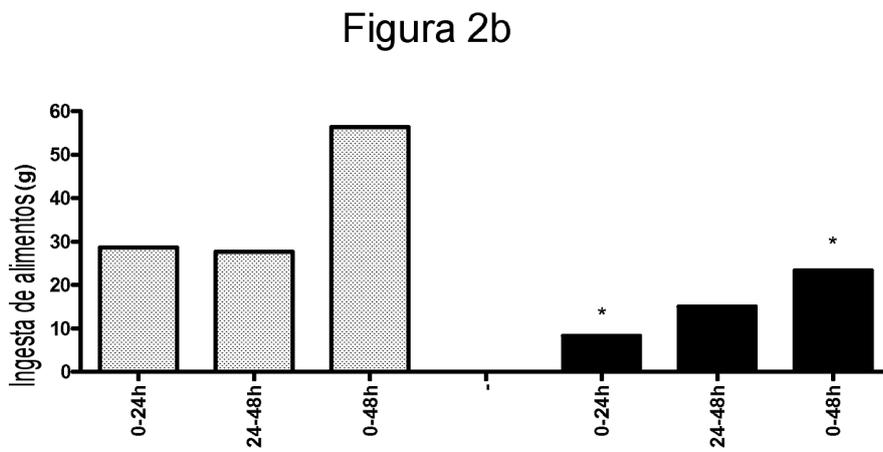
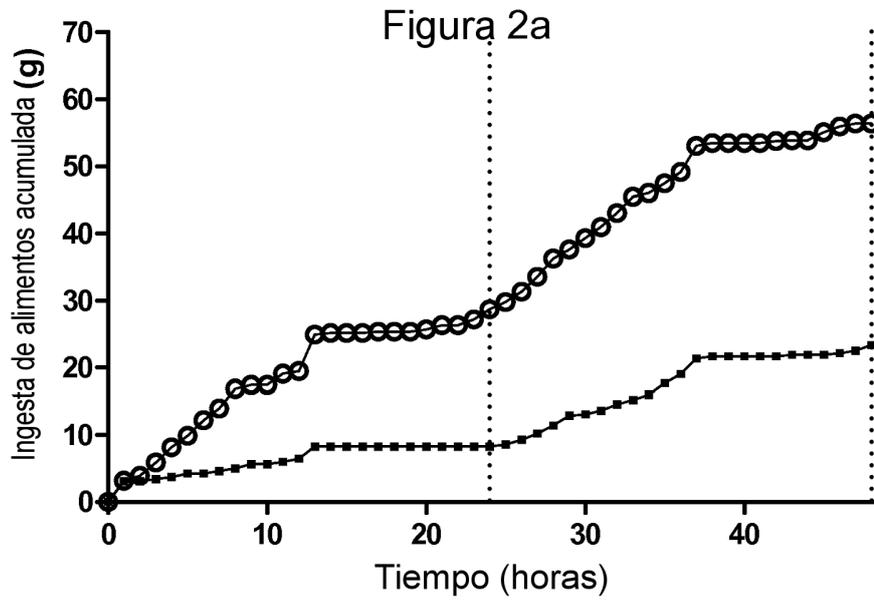


Figura 3a

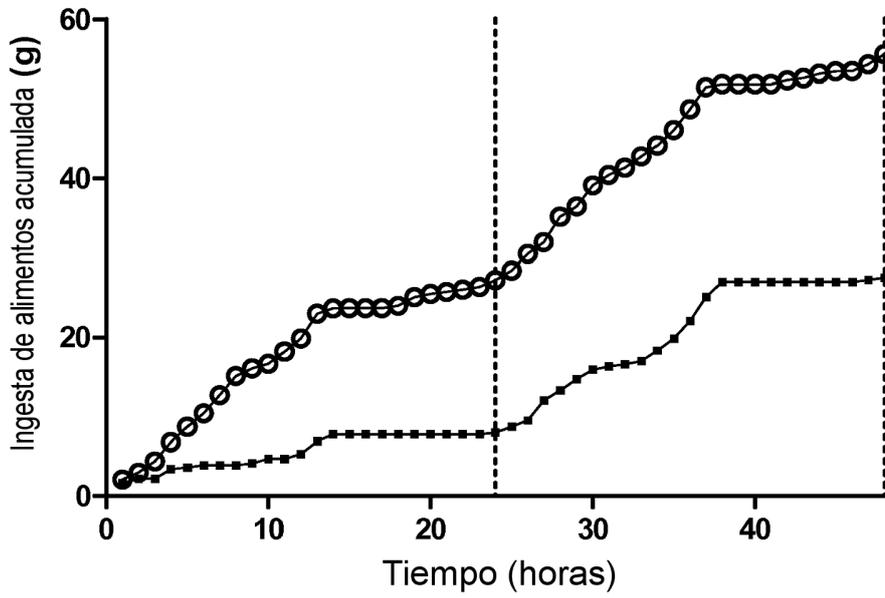
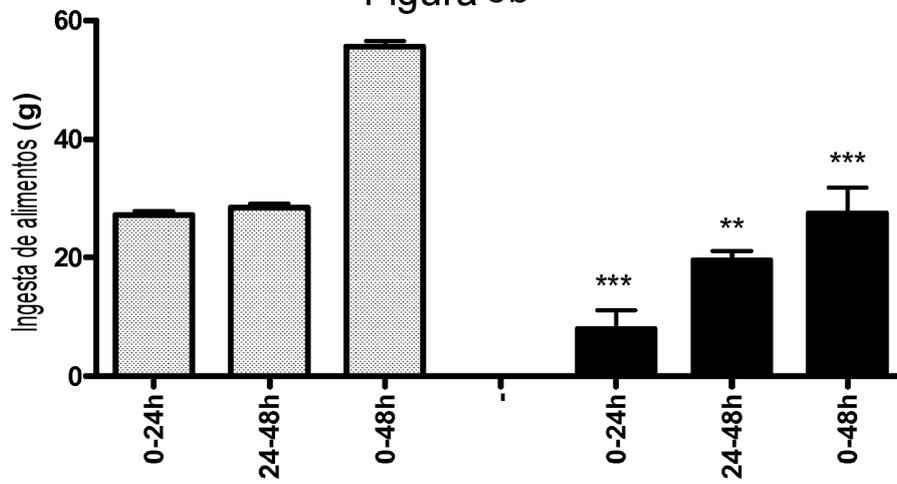
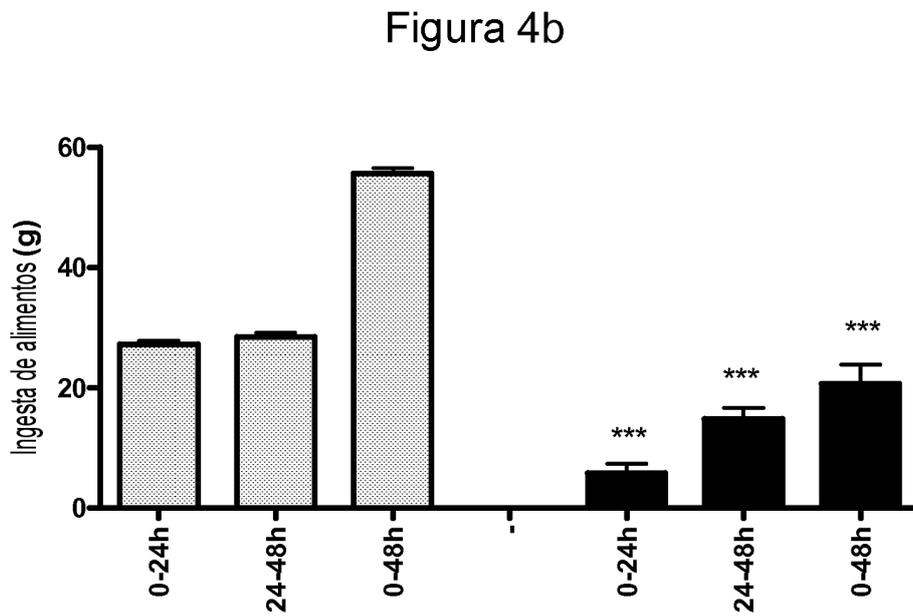
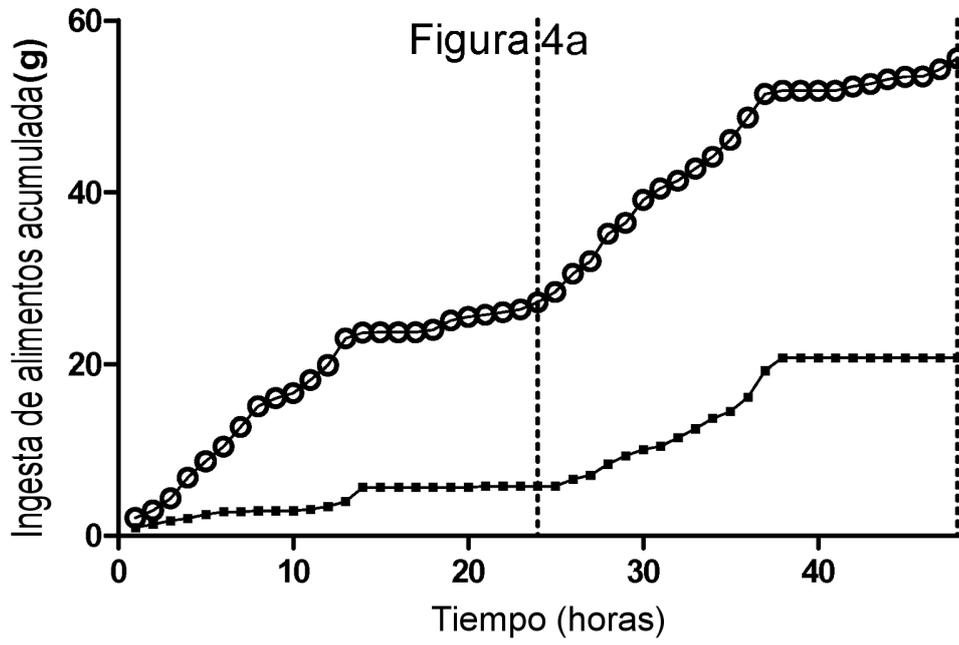


Figura 3b





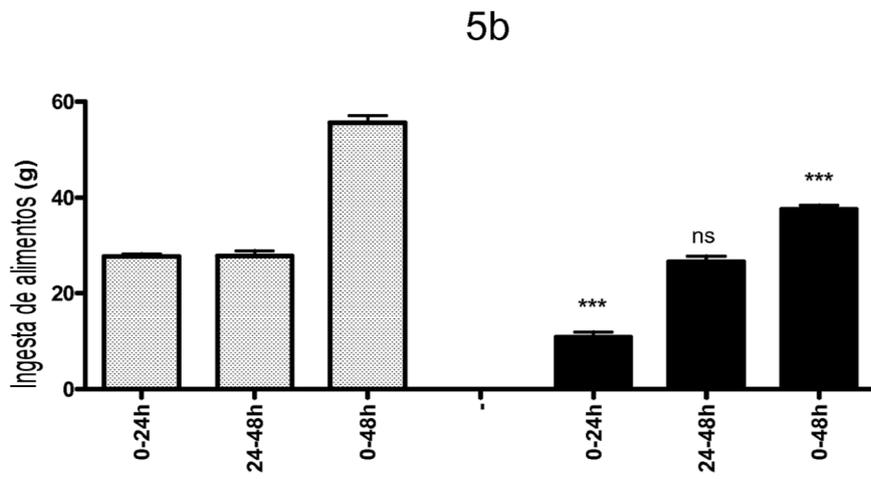
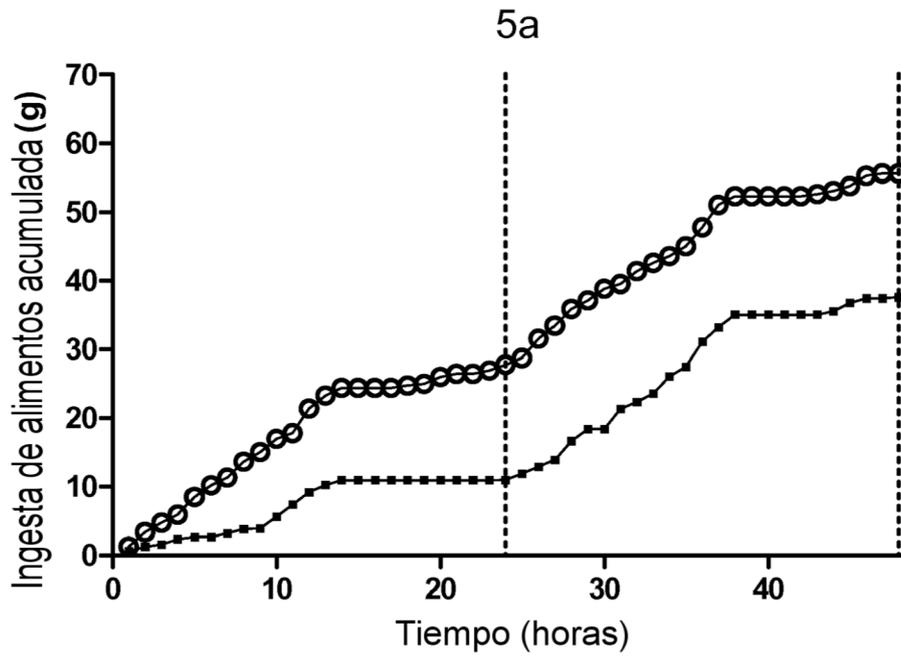


Figura 6a

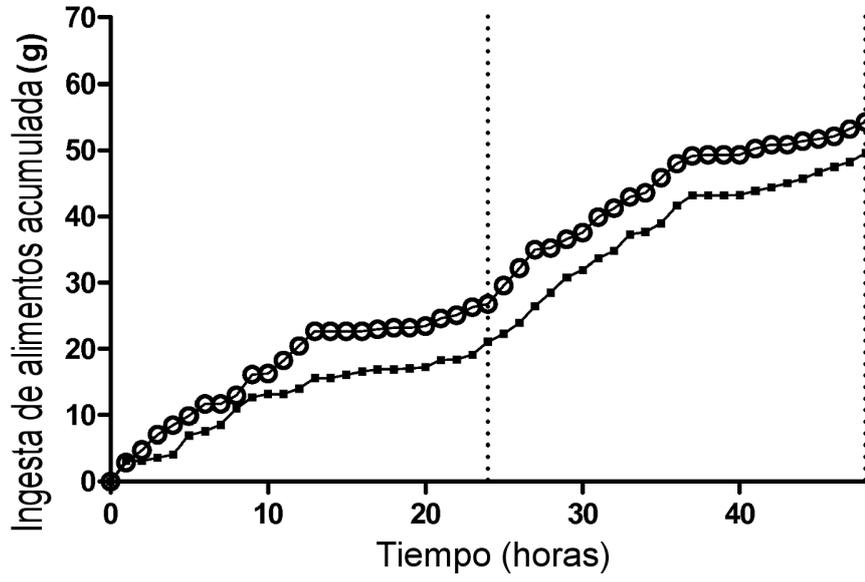


Figura 6b

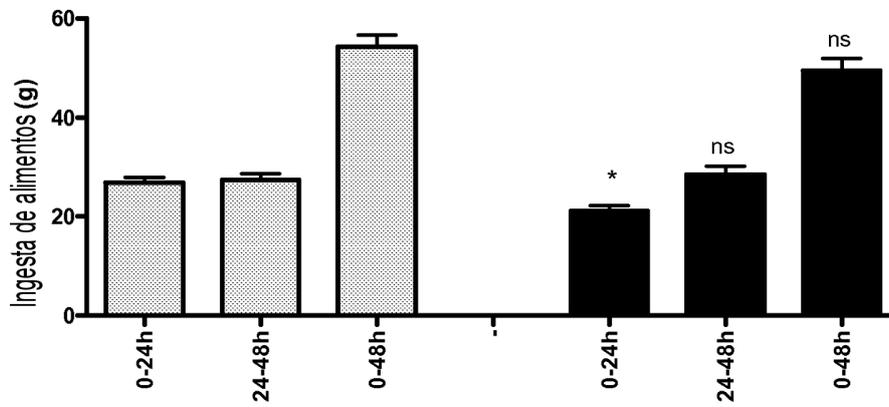


Figura 7a

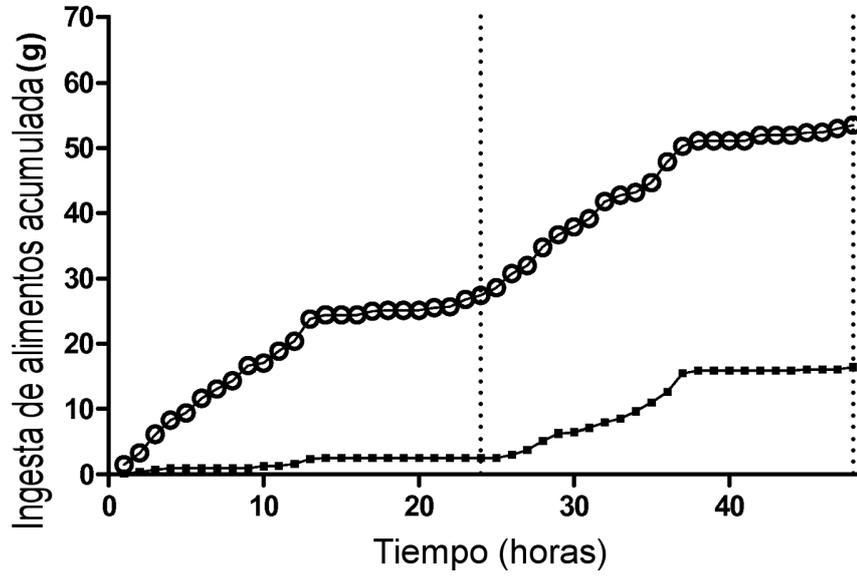


Figura 7b

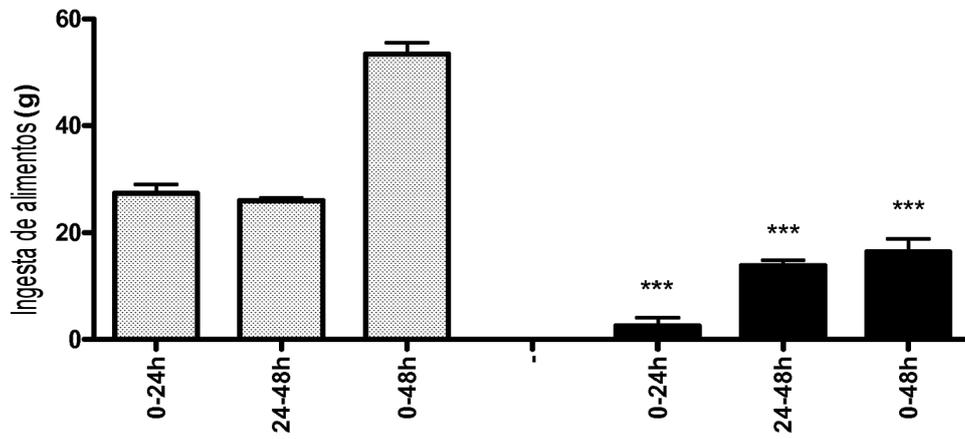


Figura 8a

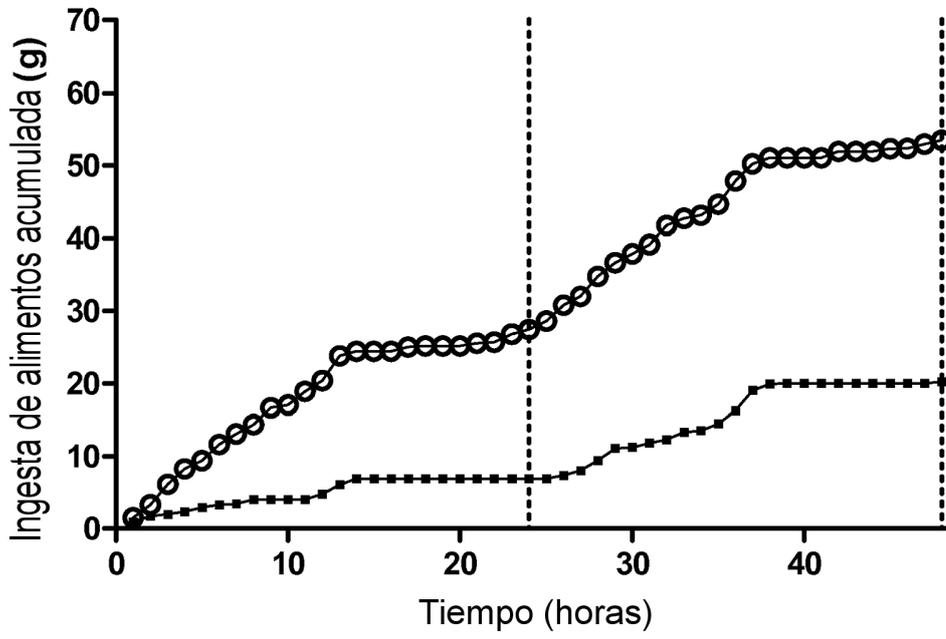


Figura 8b

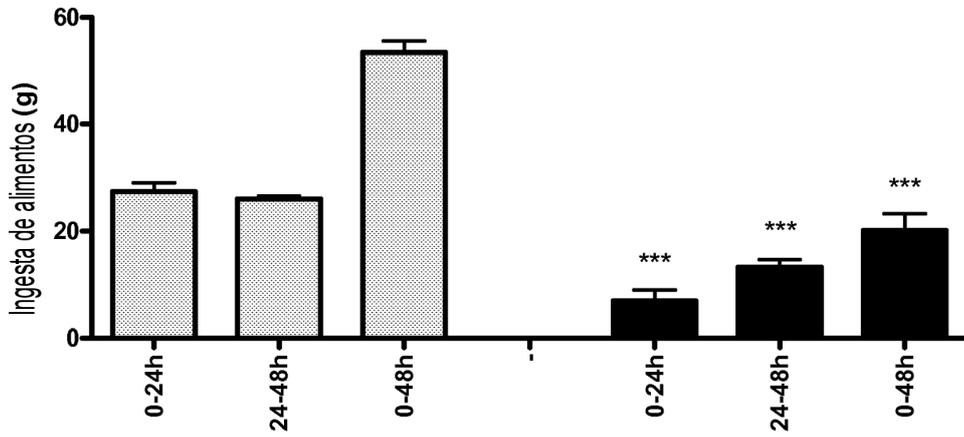


Figura 9a

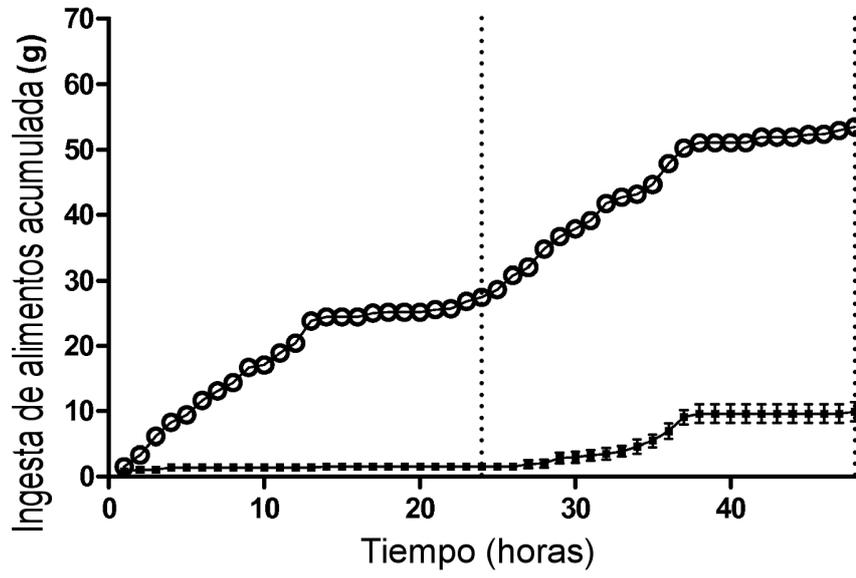


Figura 9b

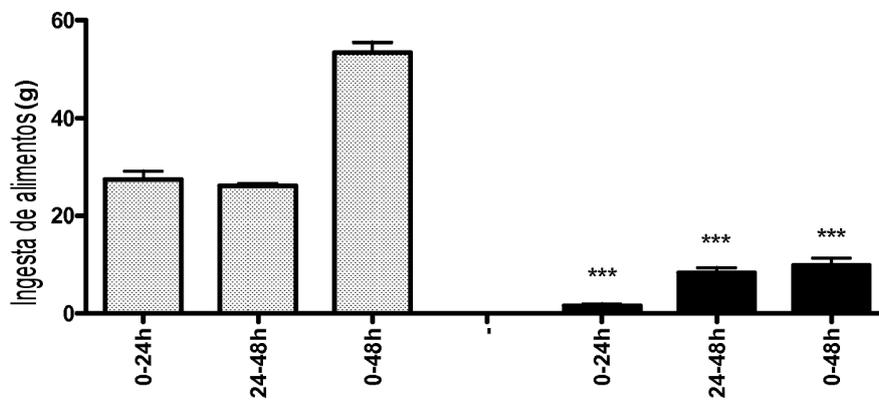


Figura 10a

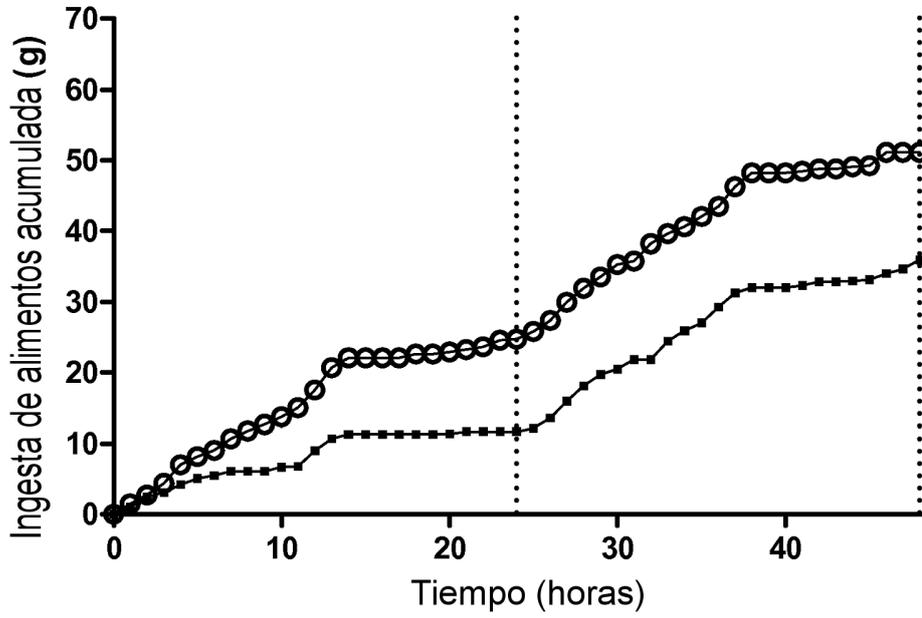


Figura 10b

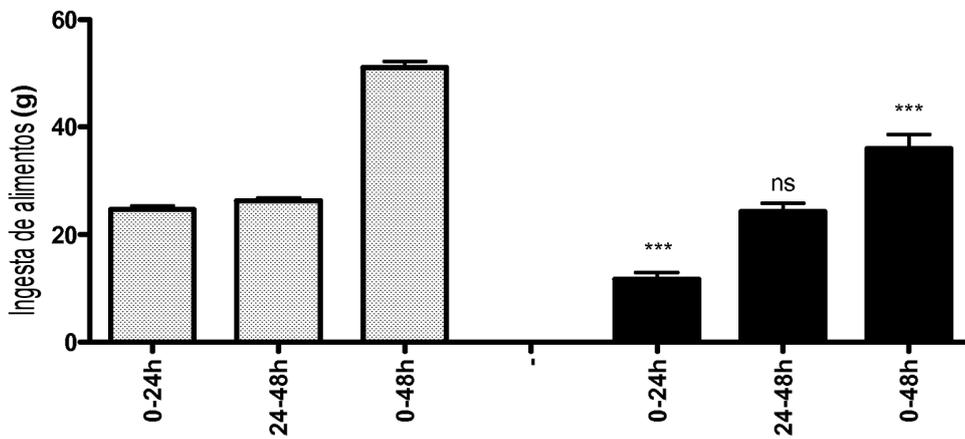


Figura 11a

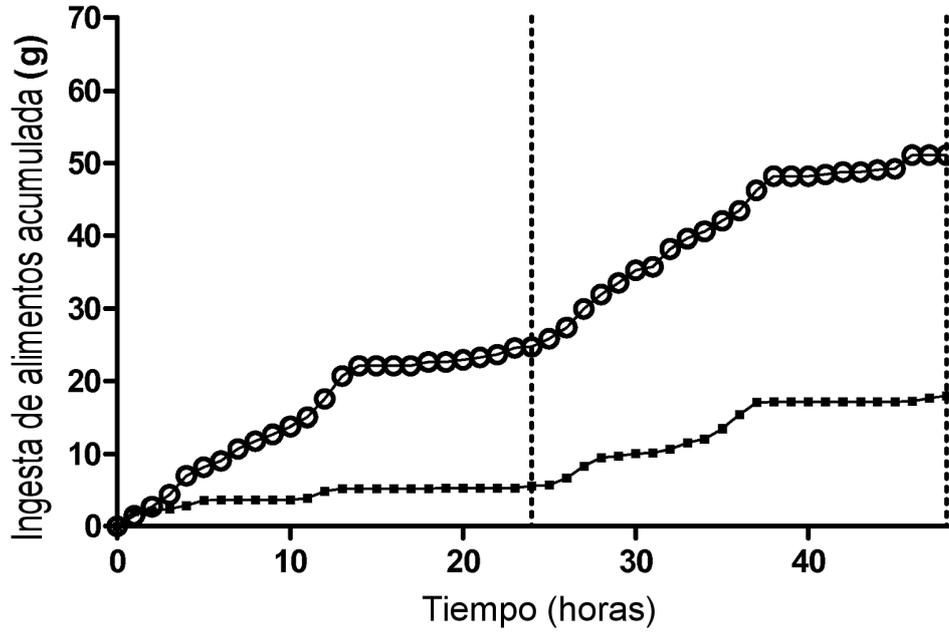


Figura 11b

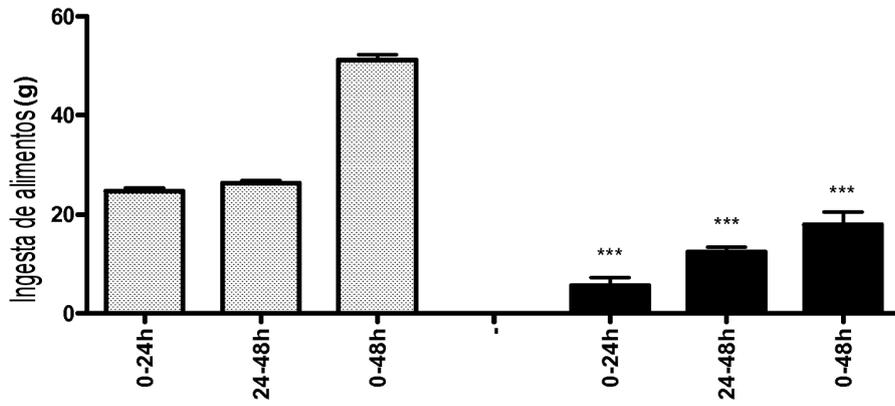


Figura 12a

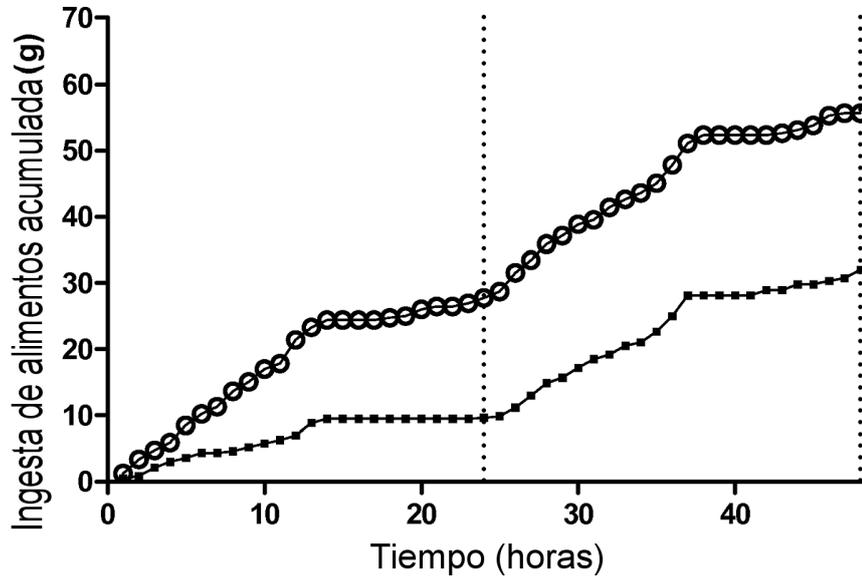


Figura 12b

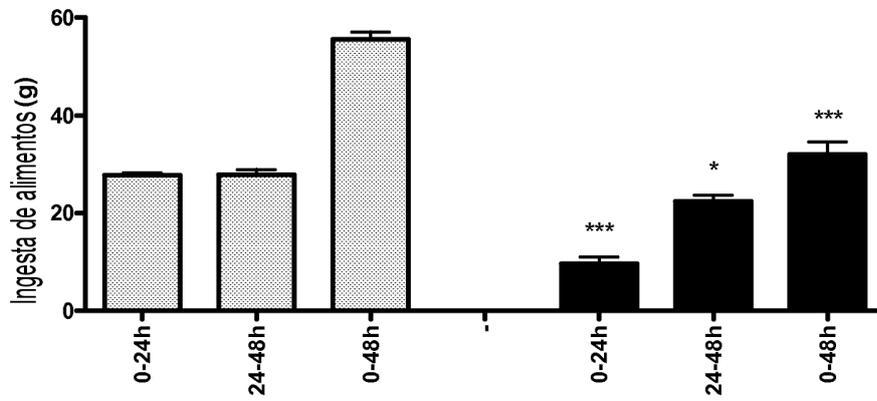


Figura 13a

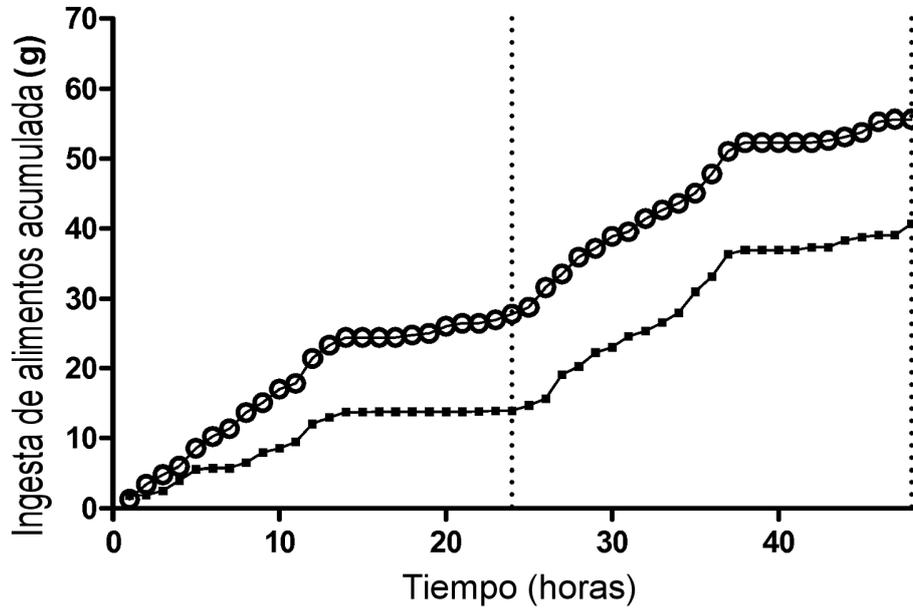


Figura 13b

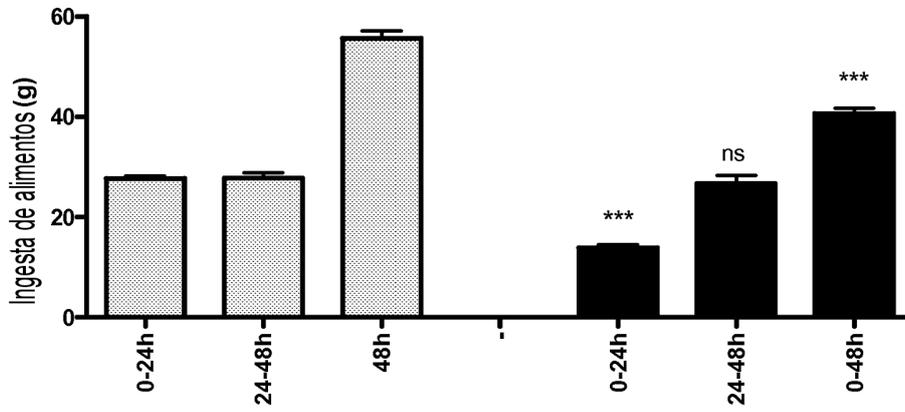


Figura 14a

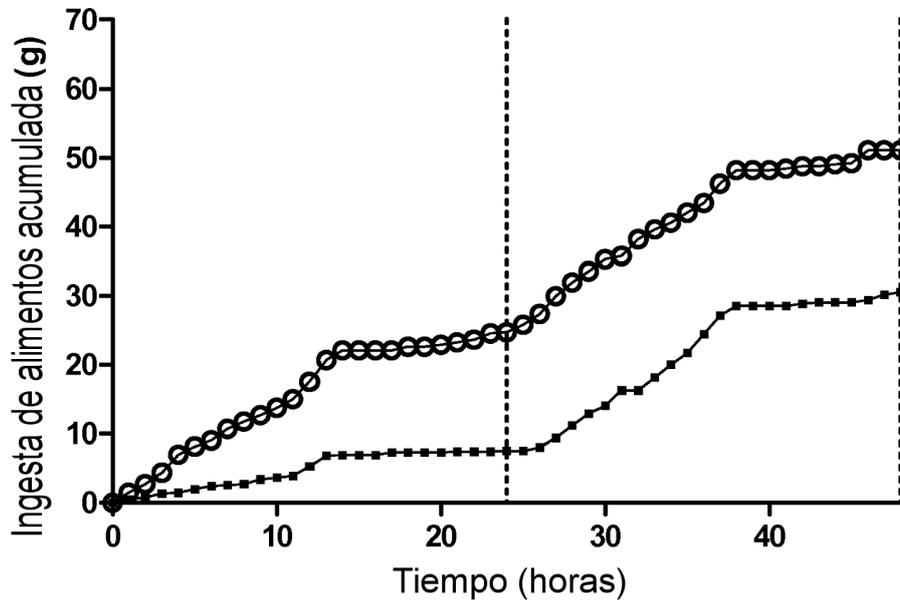


Figura 14b

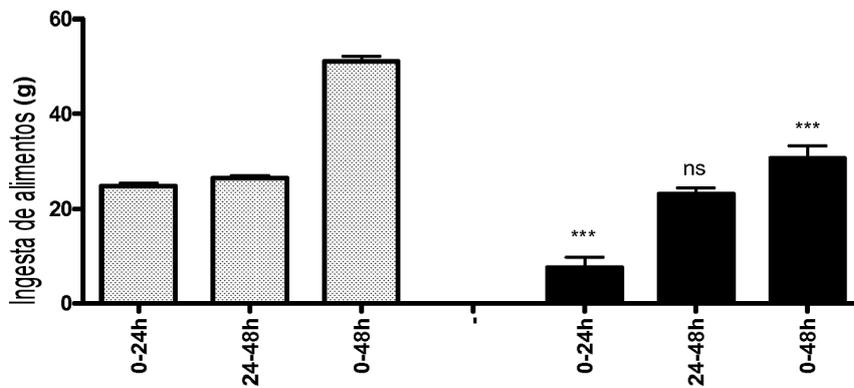


Figura 15a

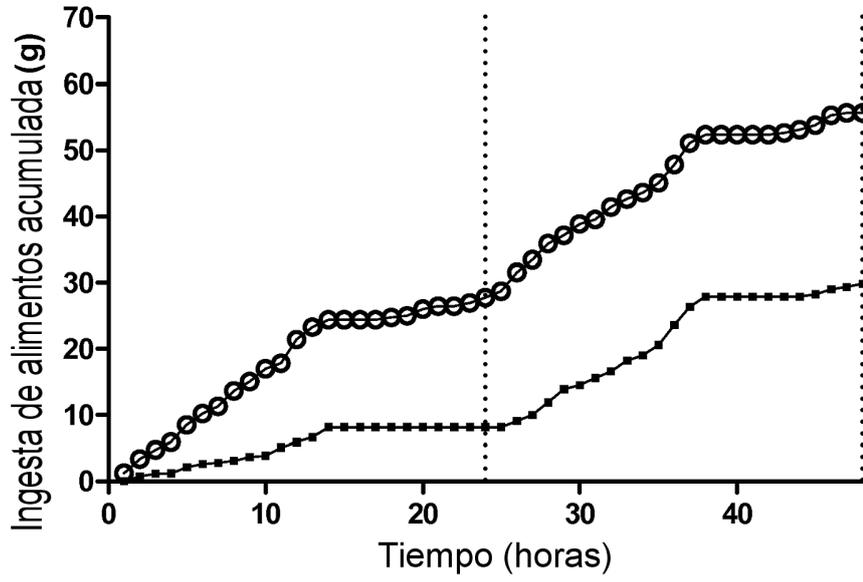


Figura 15b

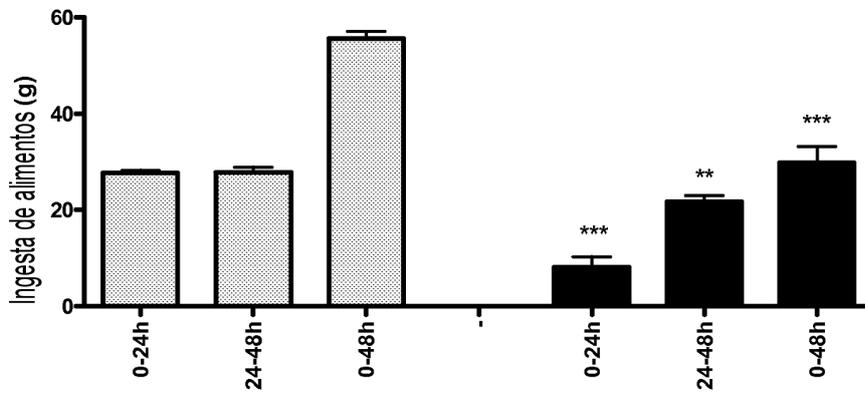


Figura 16a

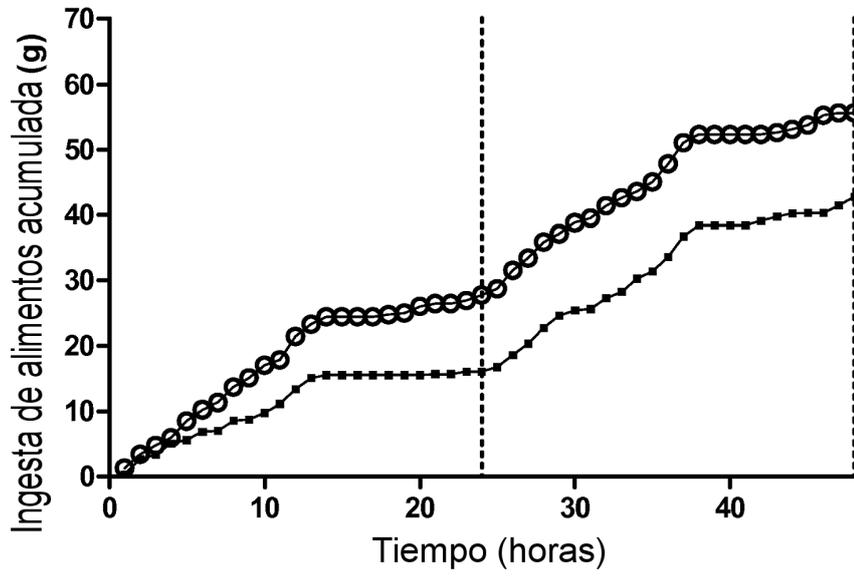


Figura 16b

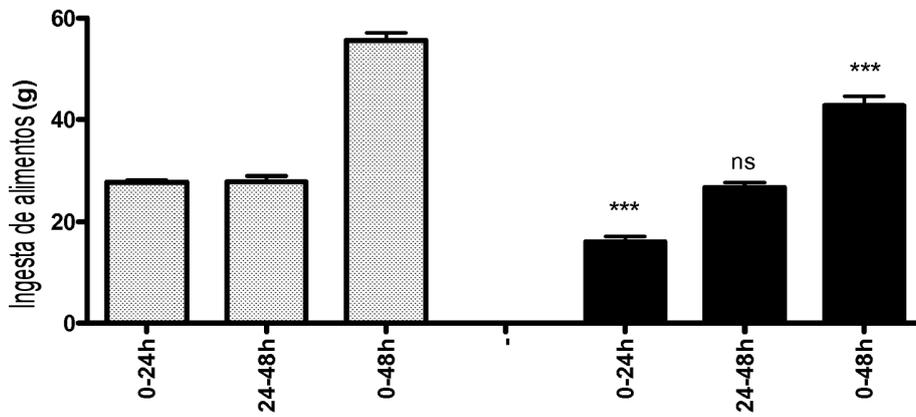


Figura 17a

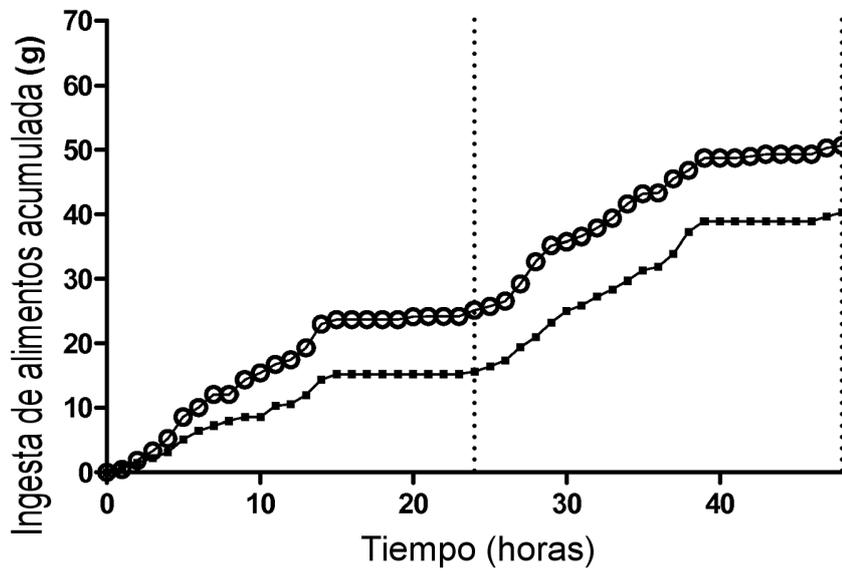


Figura 17b

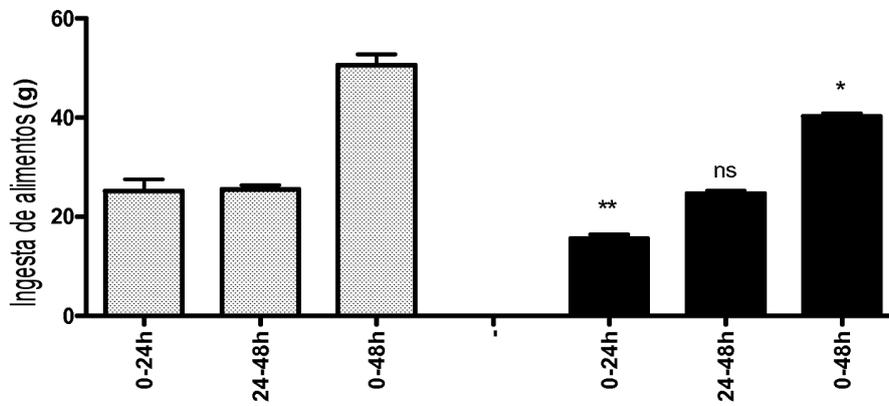


Figura 18a

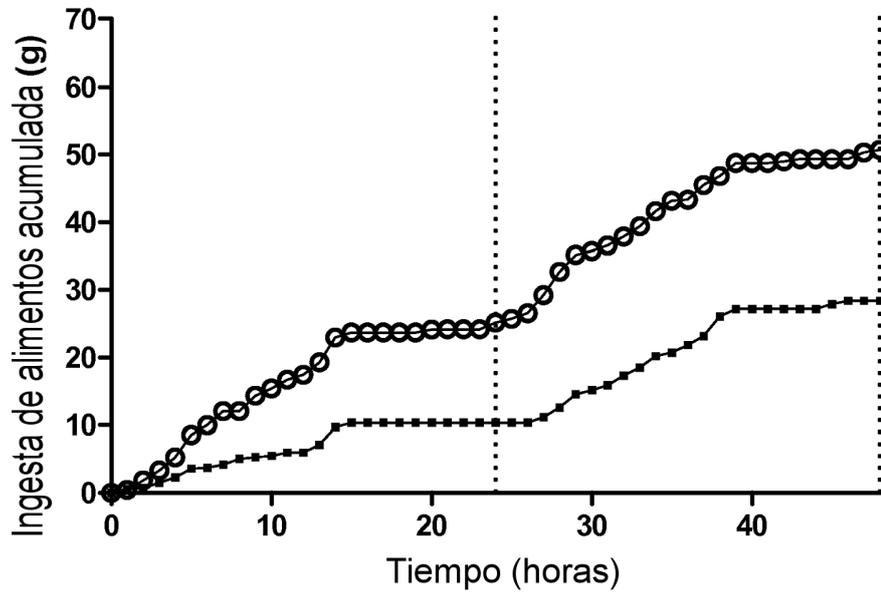


Figura 18b

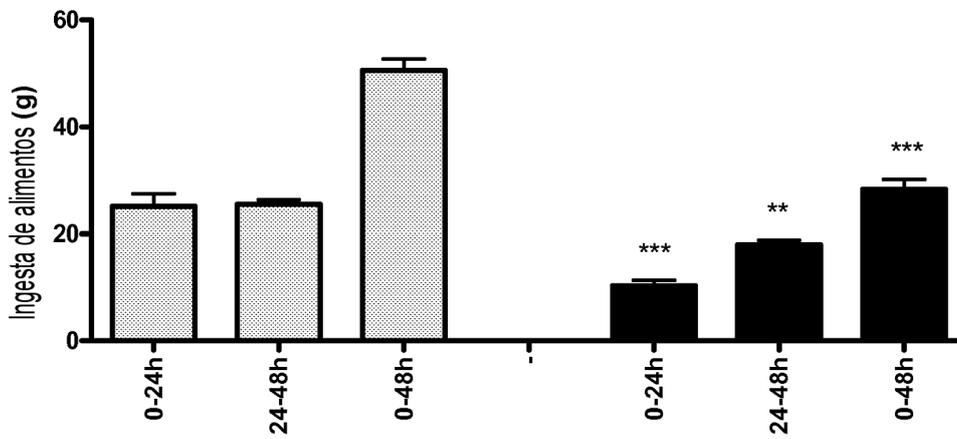


Figura 19a

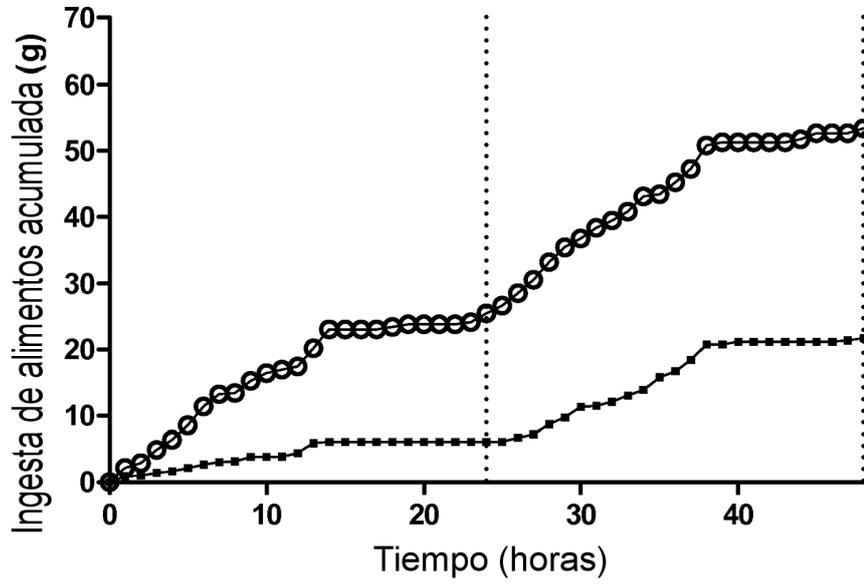


Figura 19b

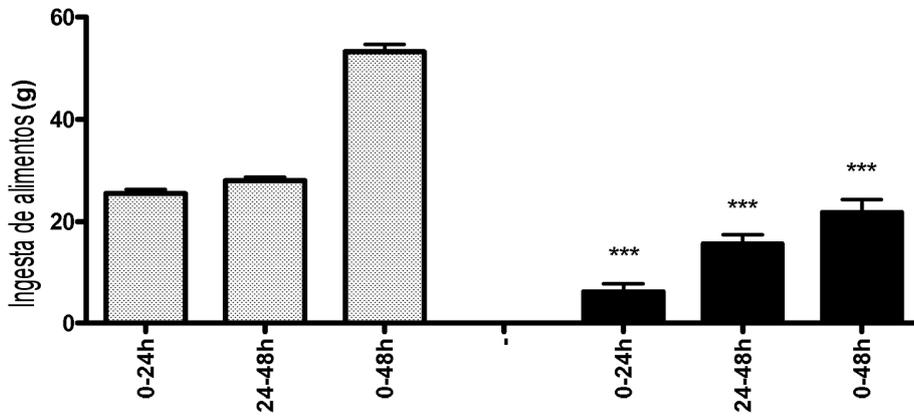


Figura 20a

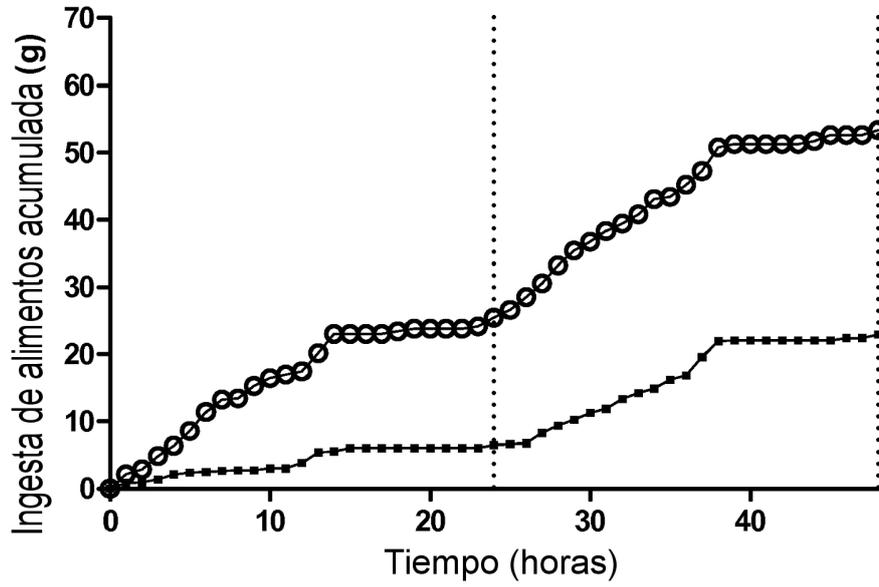


Figura 20b

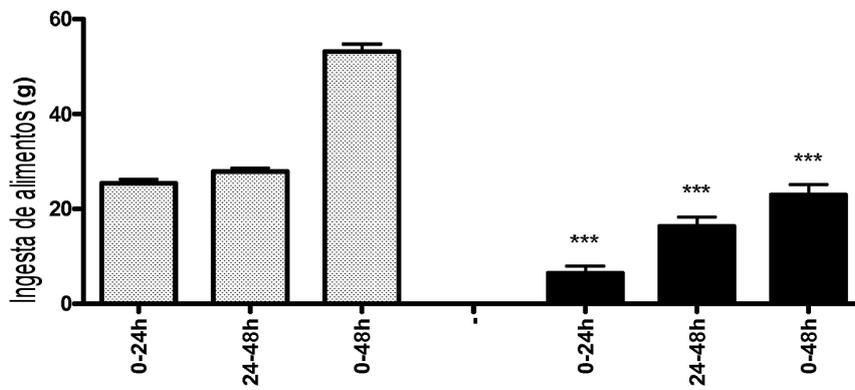


Figura 21a

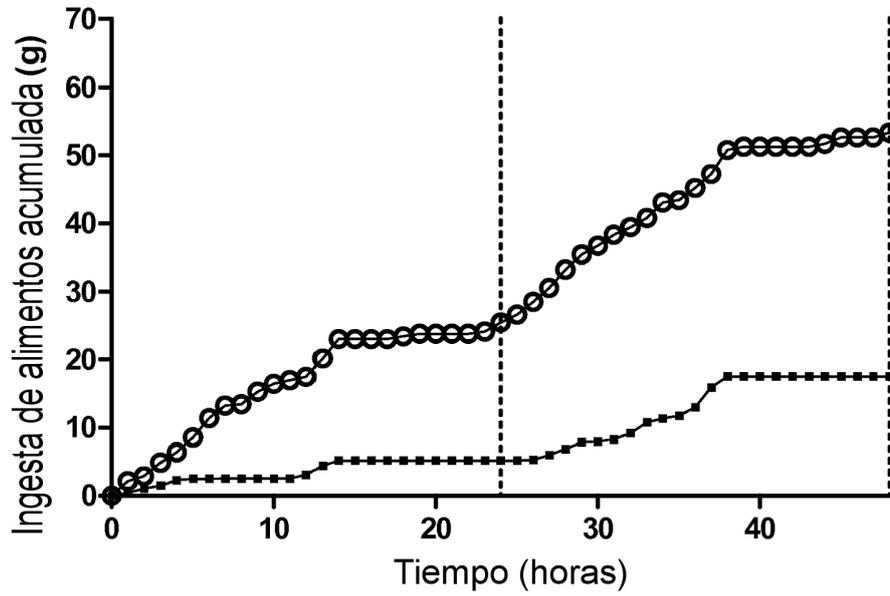


Figura 21b

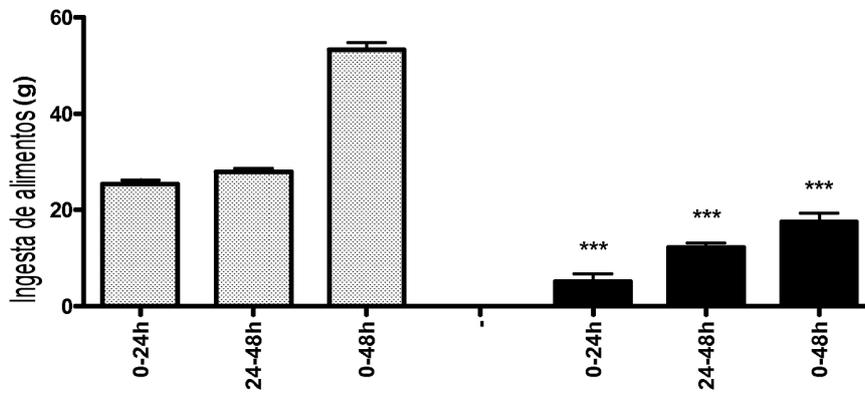


Figura 22a

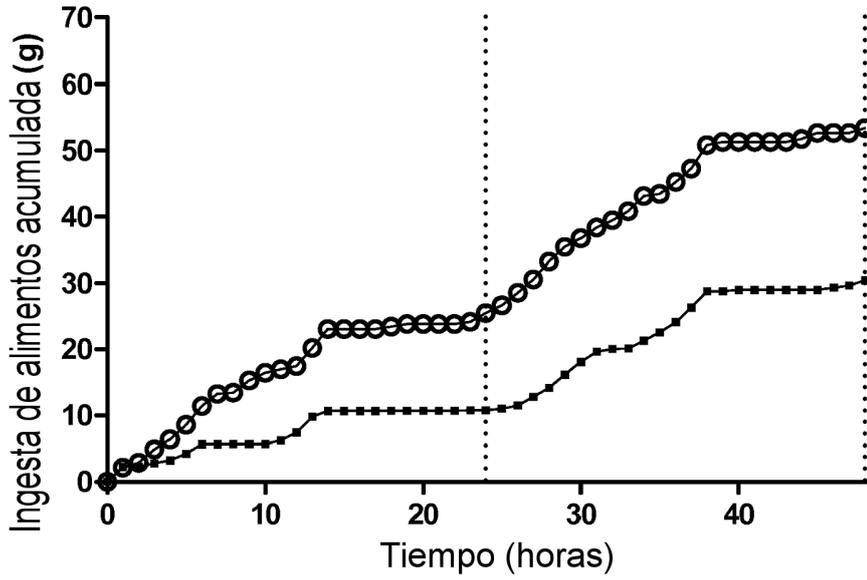


Figura 22b

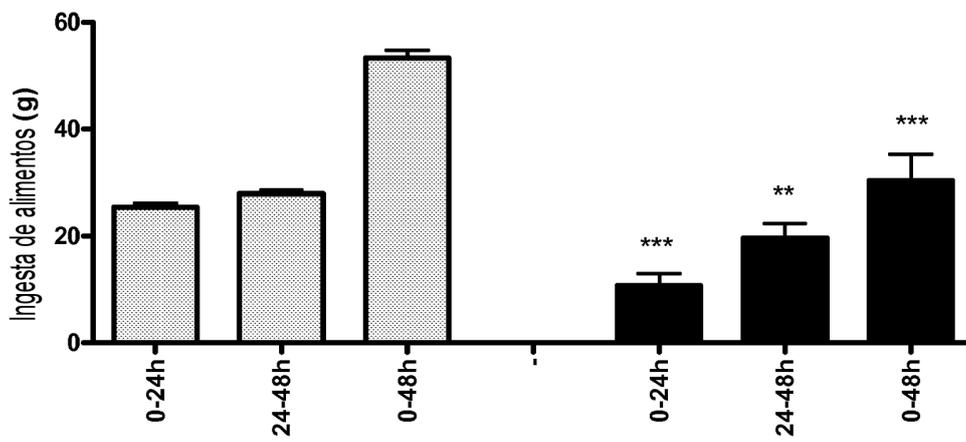


Figura 23a

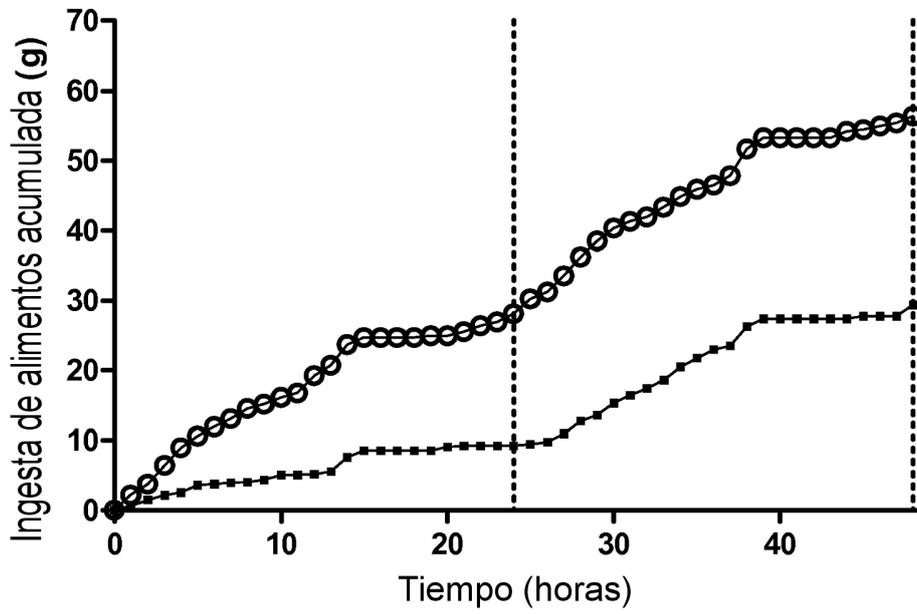


Figura 23b

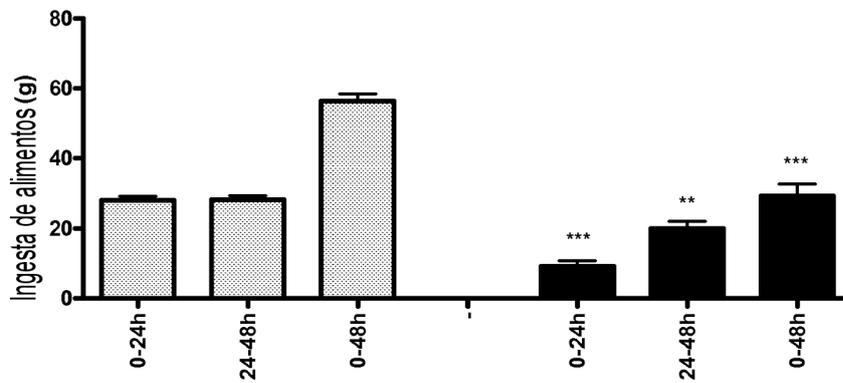


Figura 24a

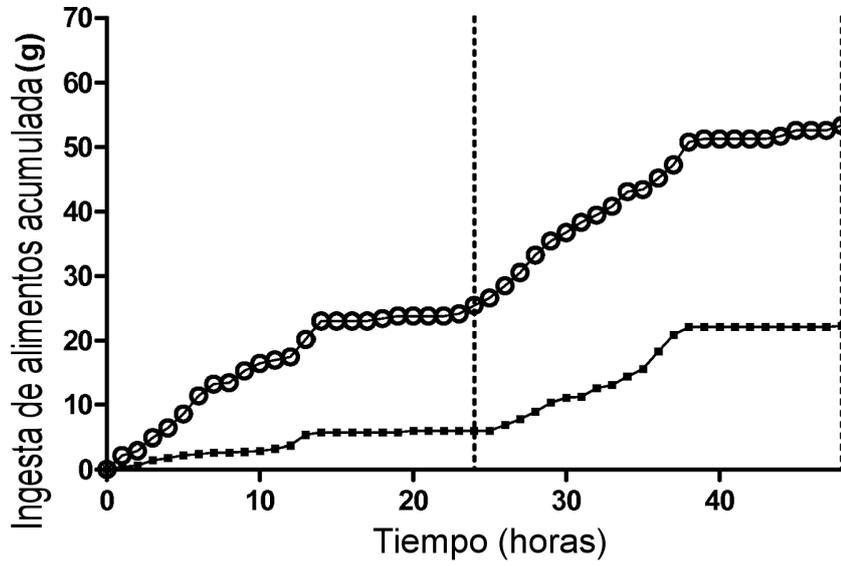


Figura 24b

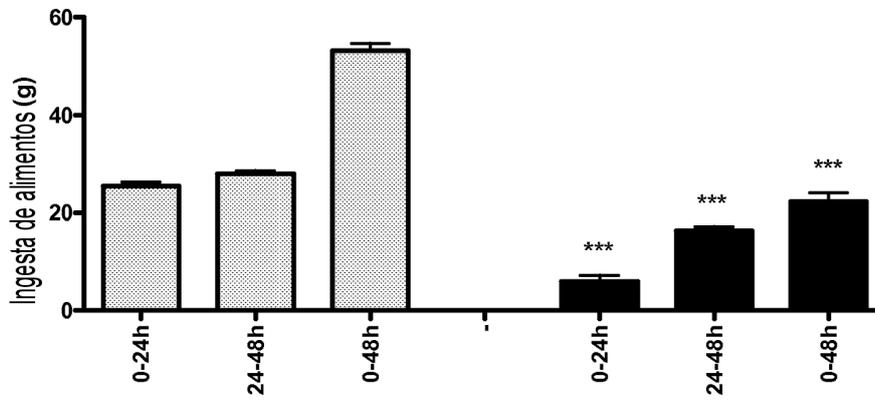


Figura 25a

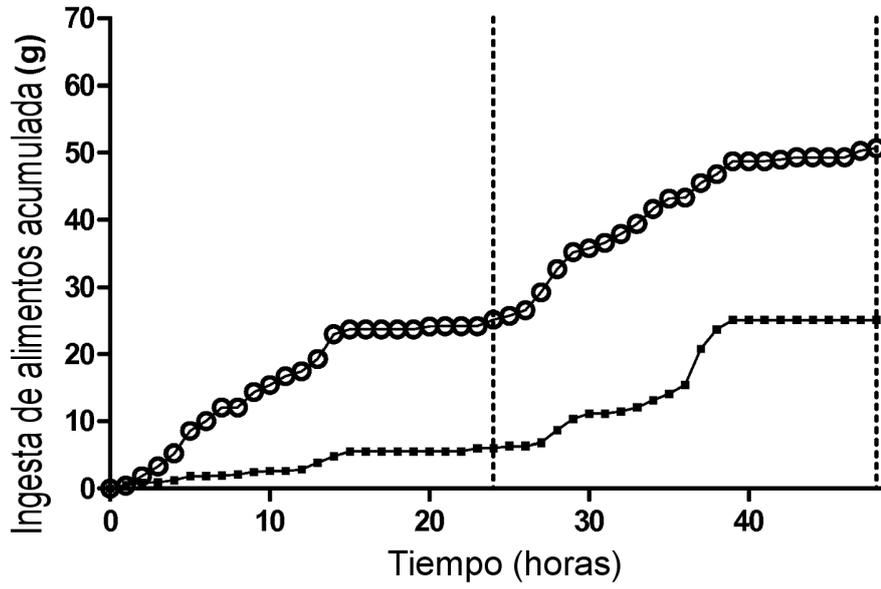


Figura 25b

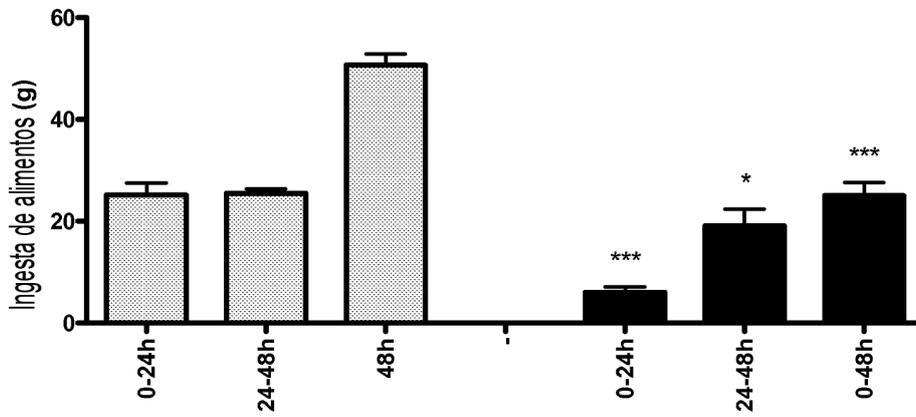


Figura 26a

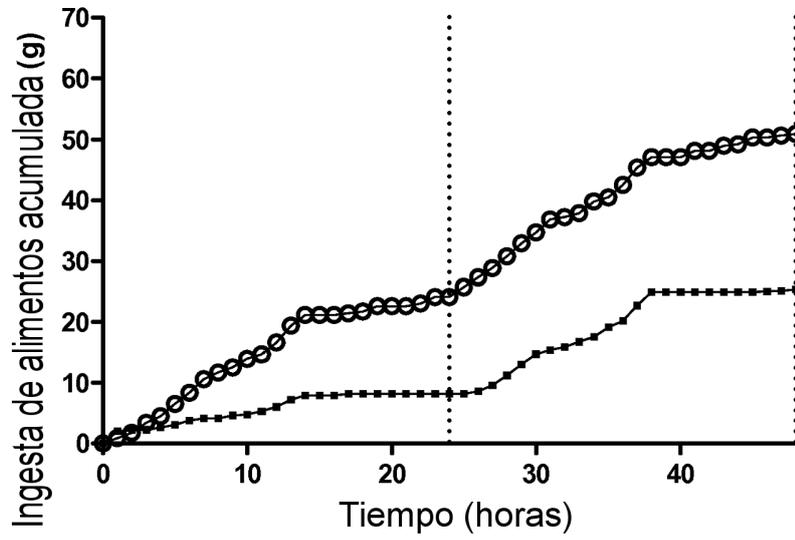


Figura 26b

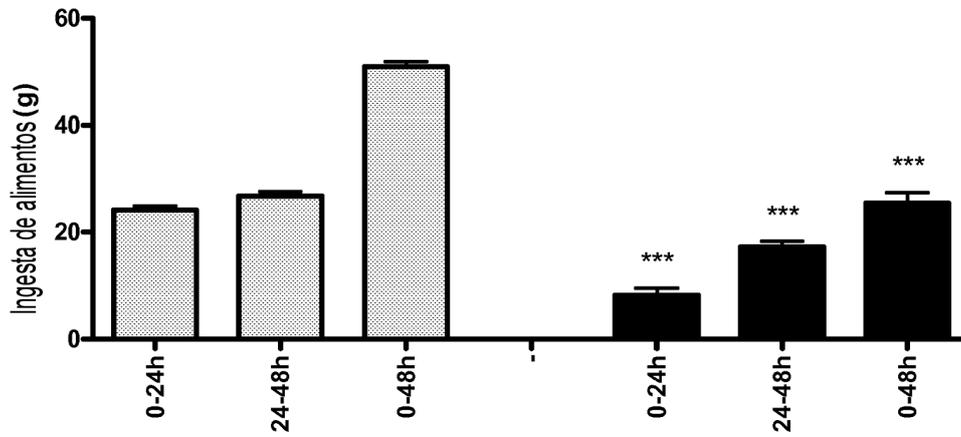


Figura 27a

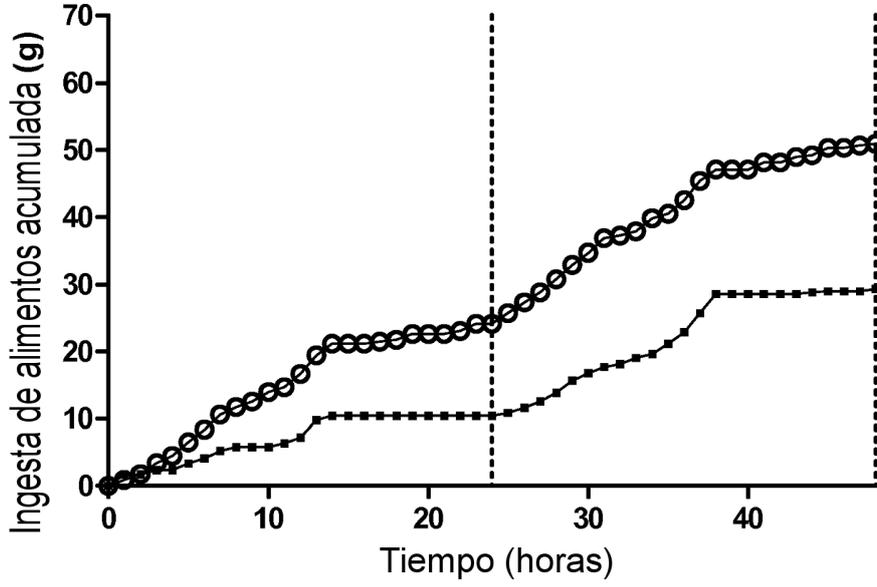


Figura 27b

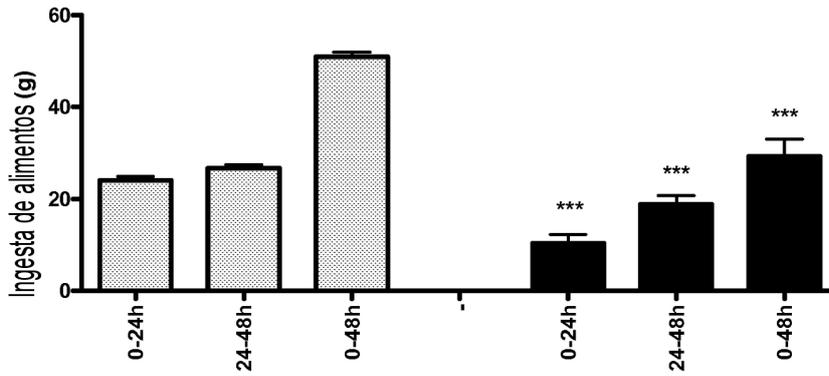


Figura 28a

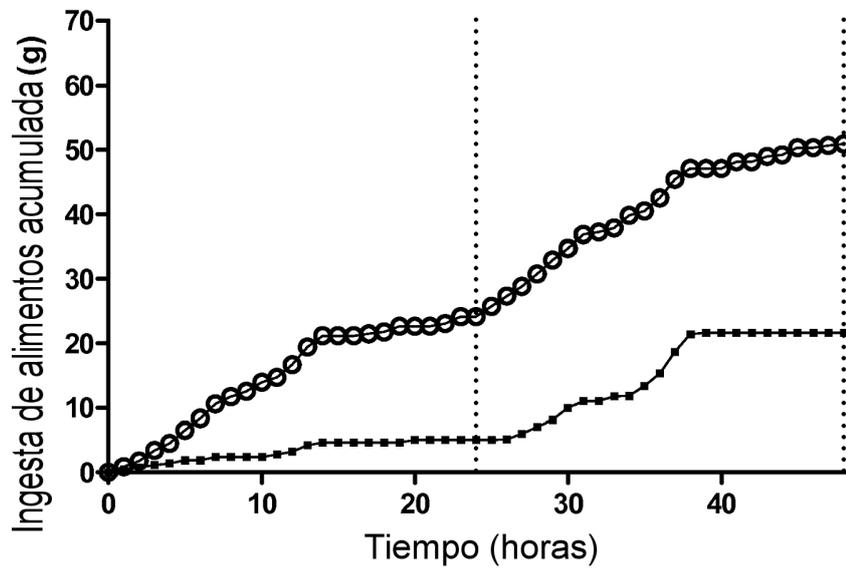


Figura 28b

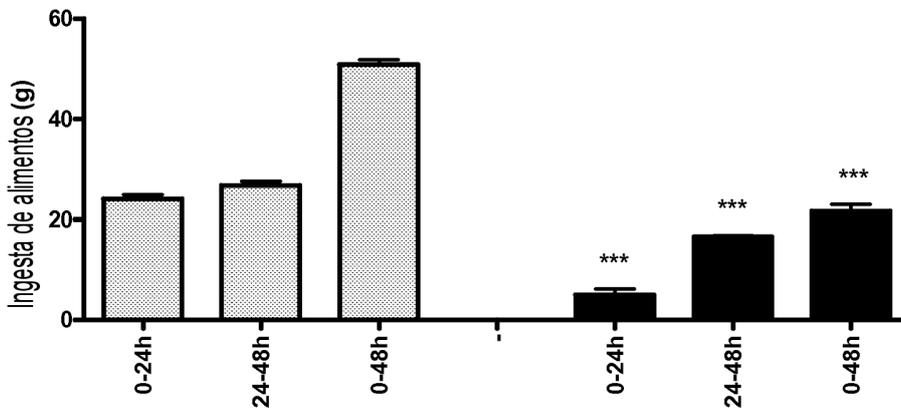


Figura 29a

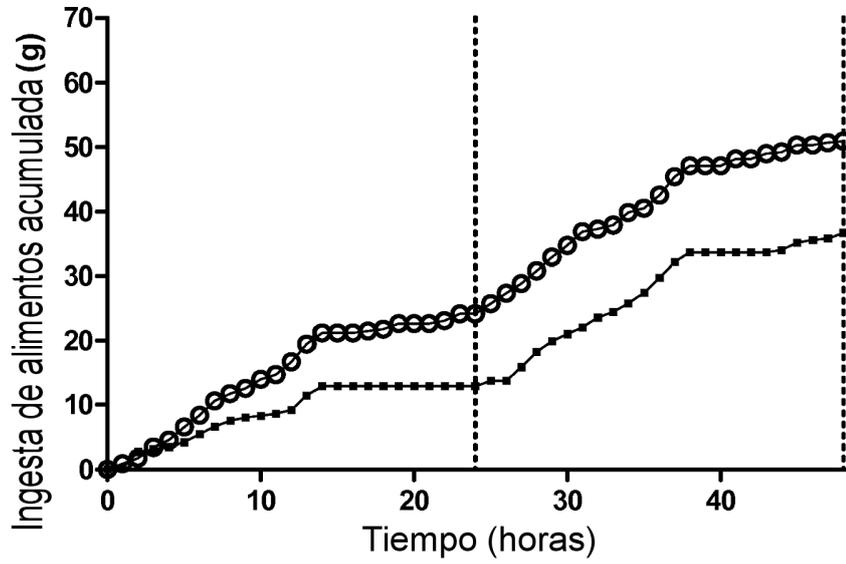


Figura 29b

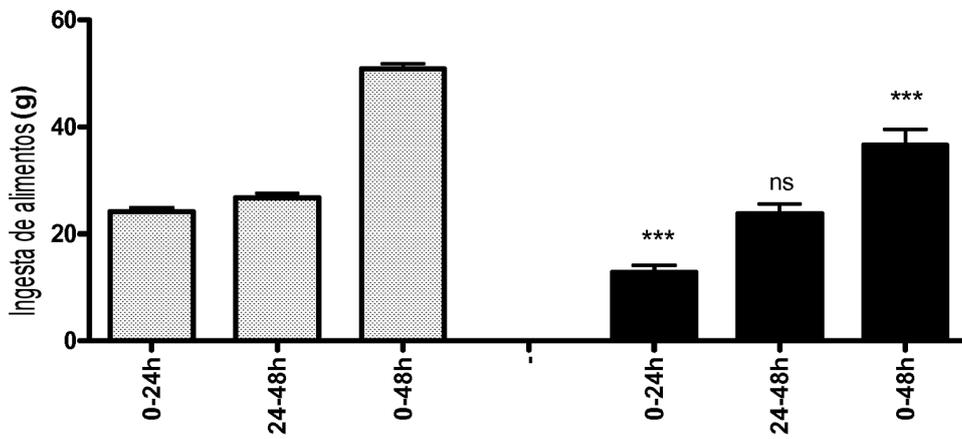


Figura 30a

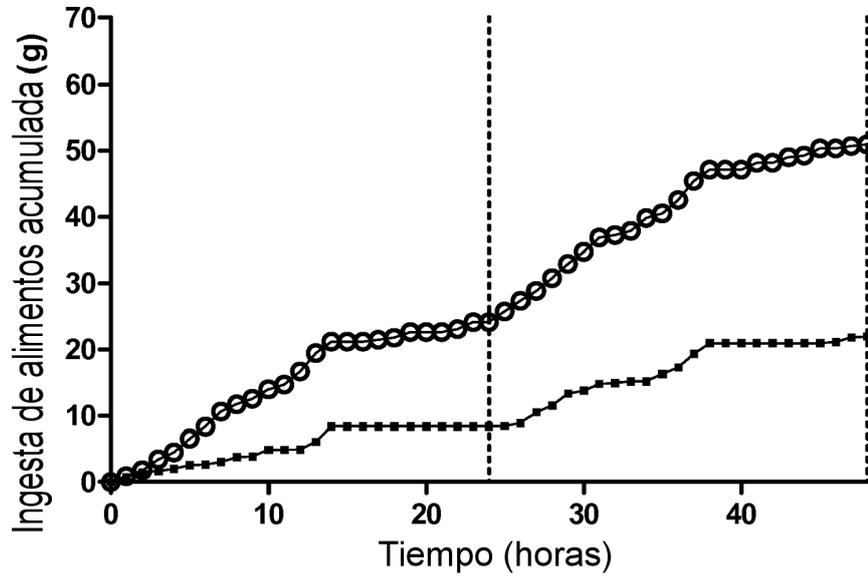


Figura 30b

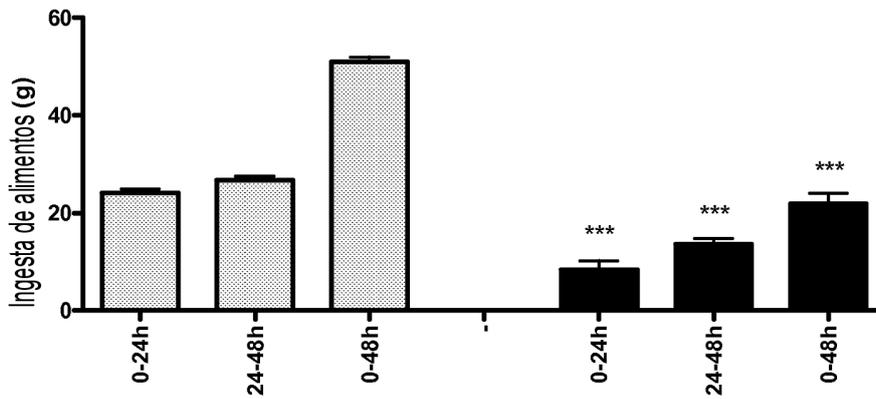


Figura 31a

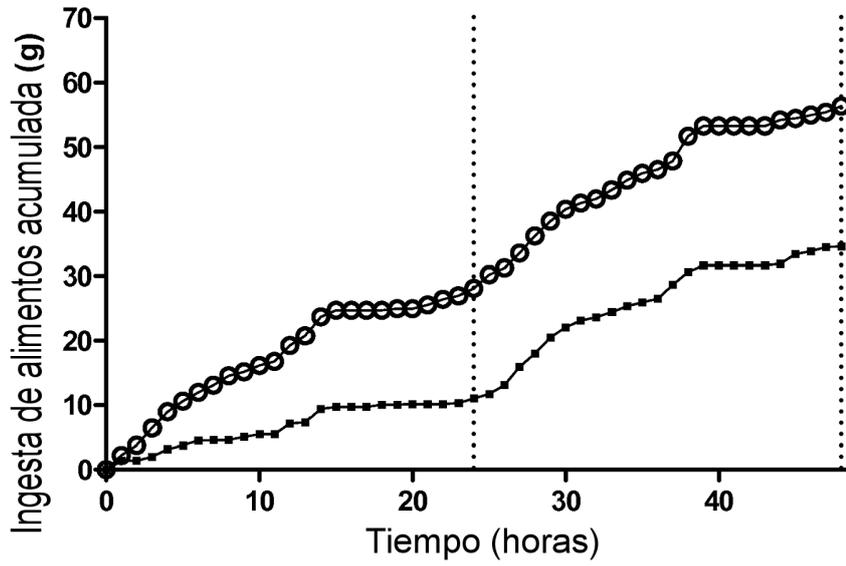


Figura 31b

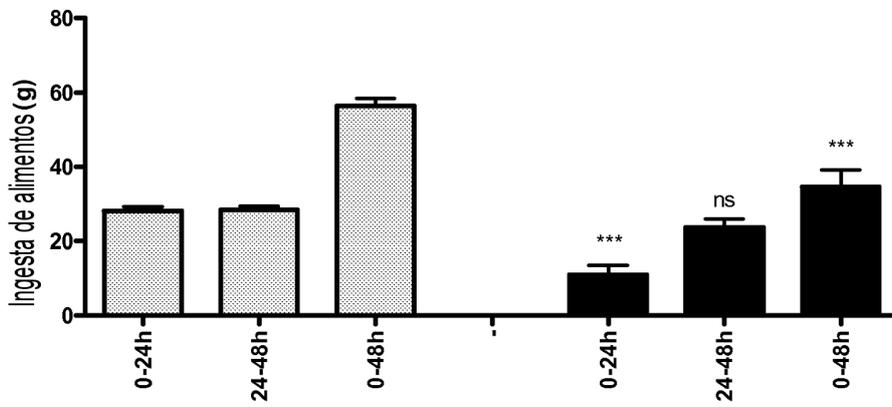


Figura 32a

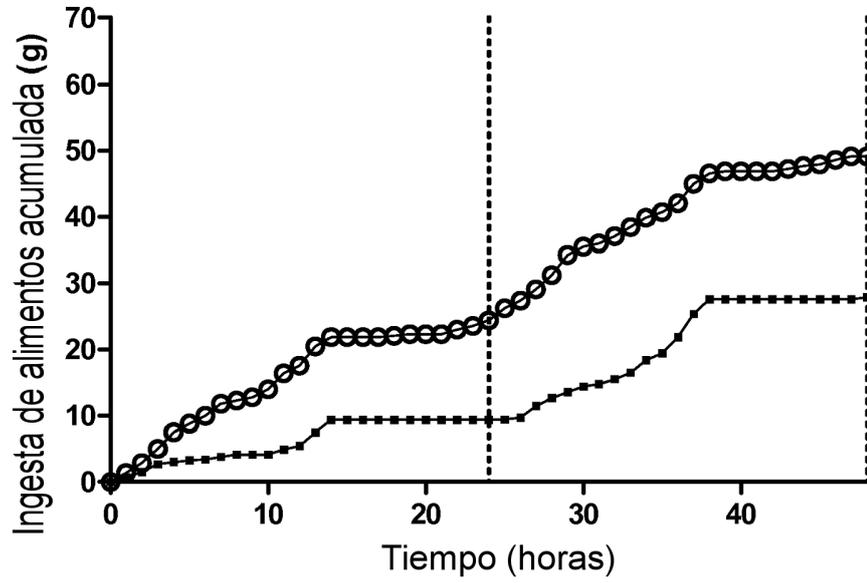


Figura 32b

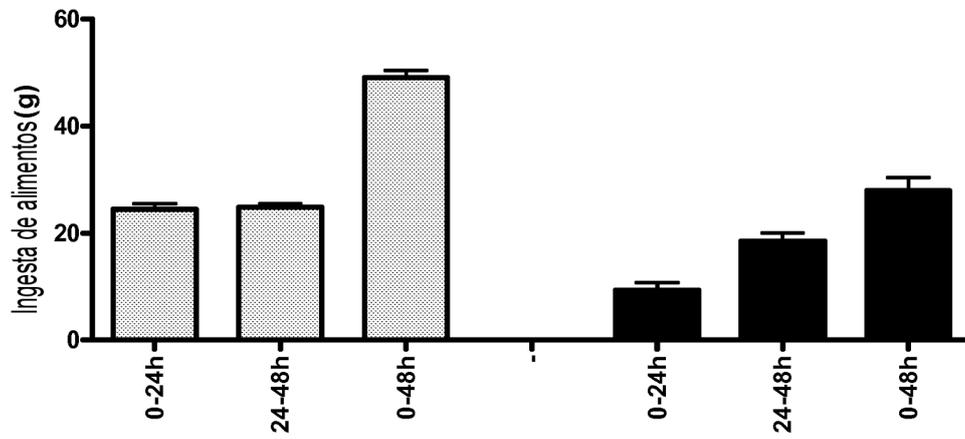


Figura 33a

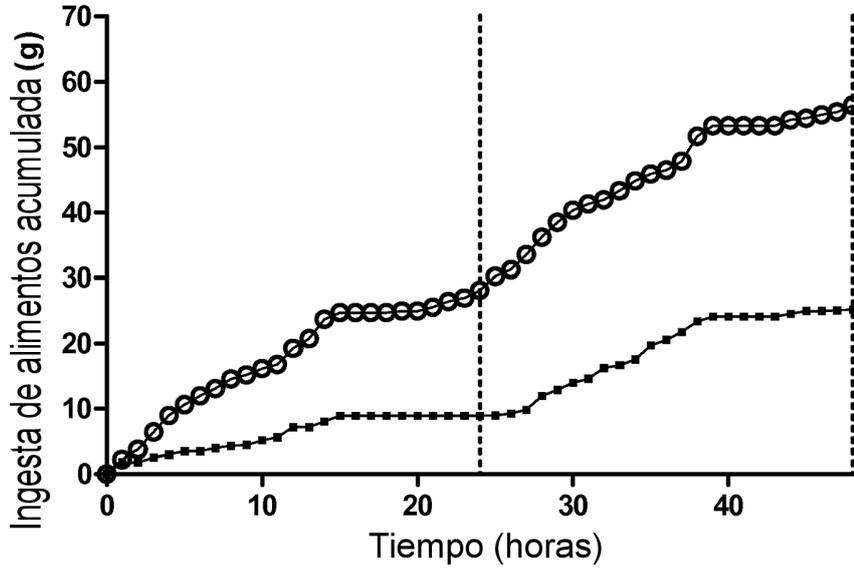


Figura 33b

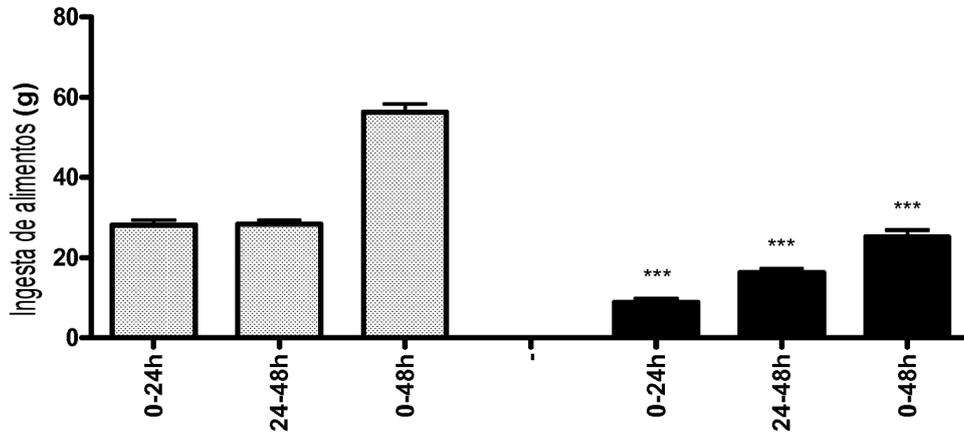


Figura 34a

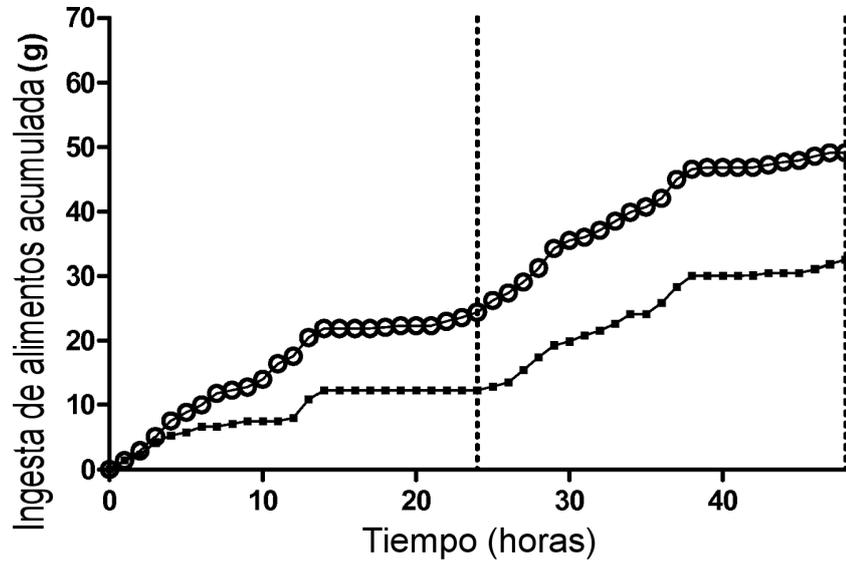


Figura 34b

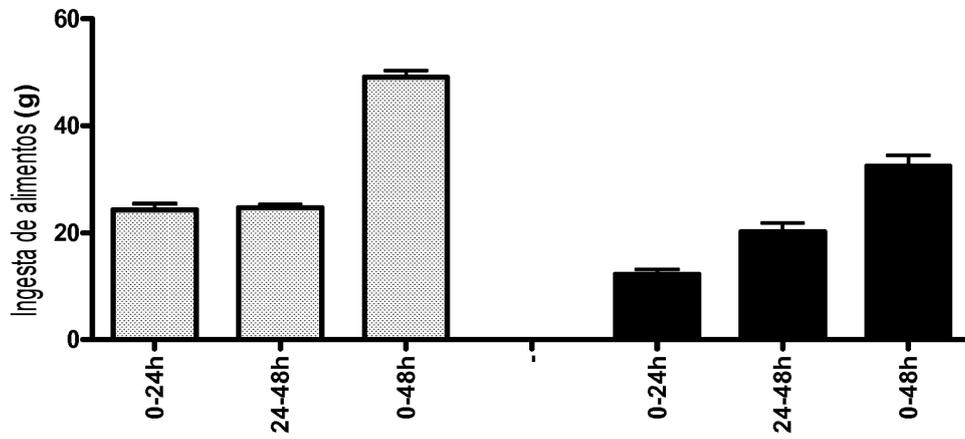


Figura 35a

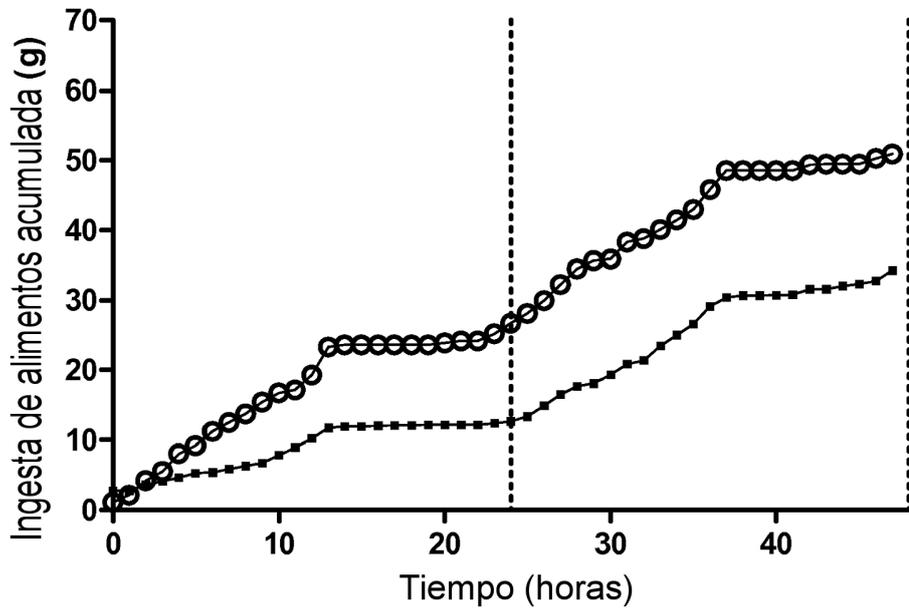


Figura 35b

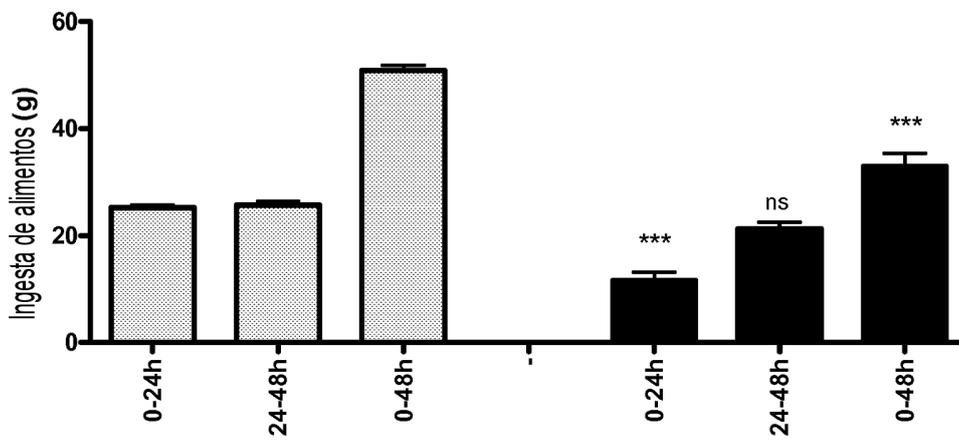


Figura 36a

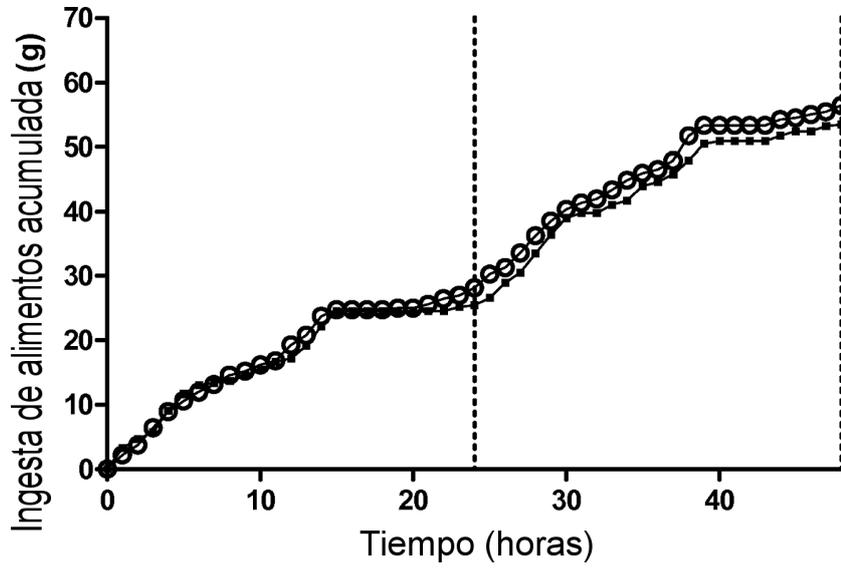


Figura 36b

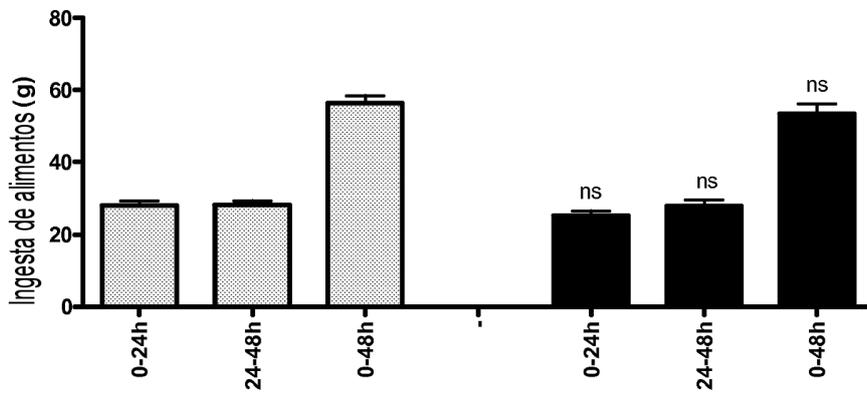


Figura 37a

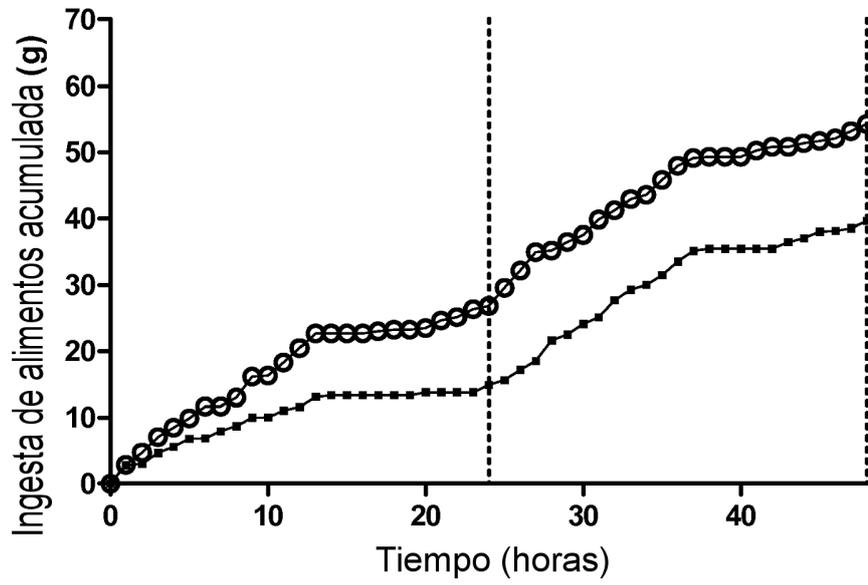


Figura 37b

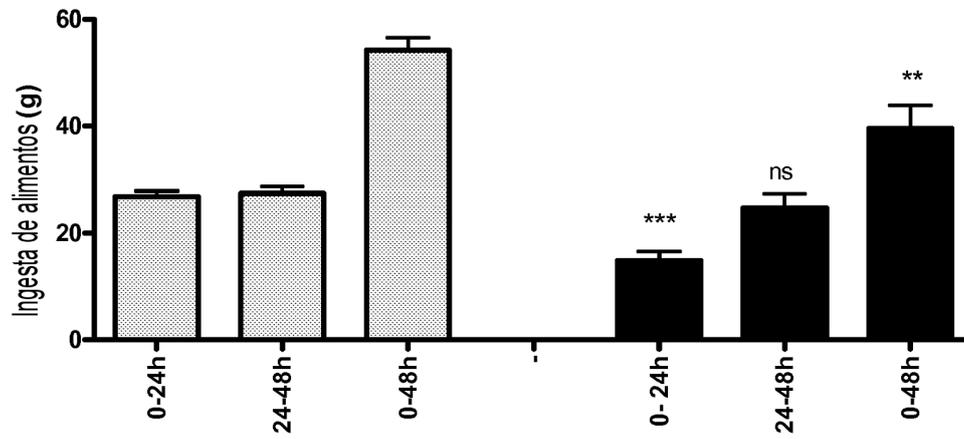


Figura 38a

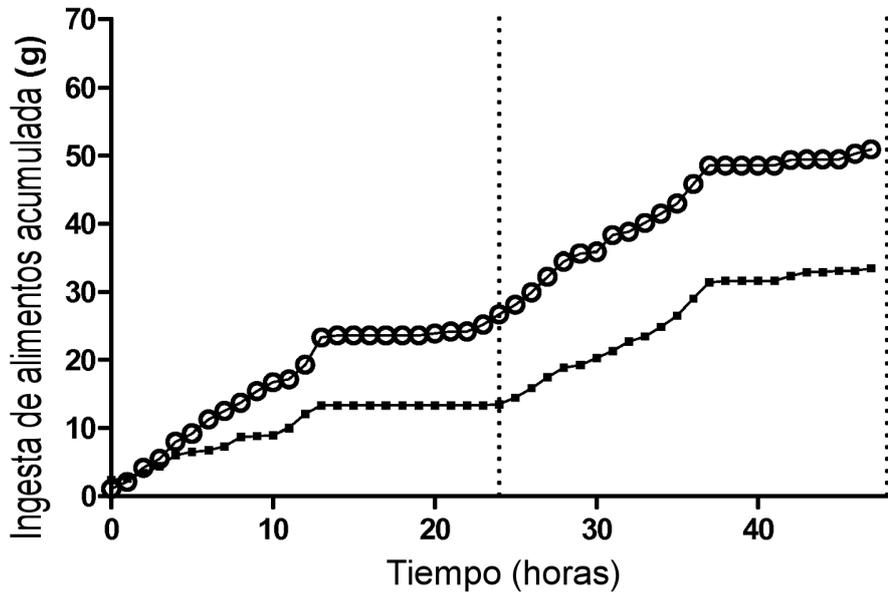


Figura 38b

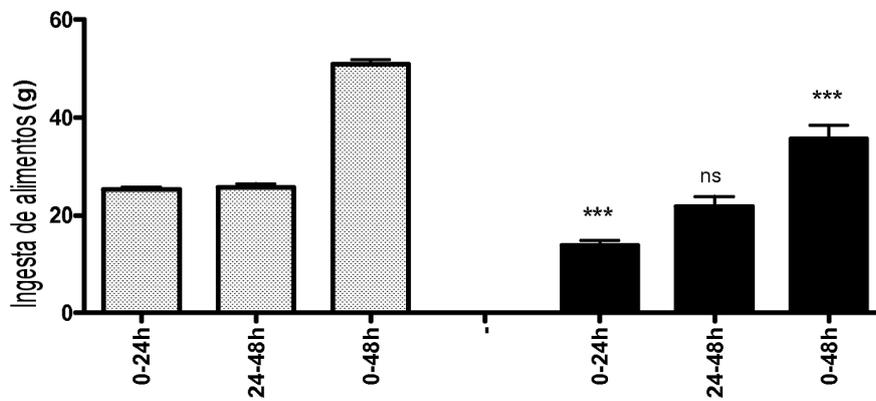


Figura 39a

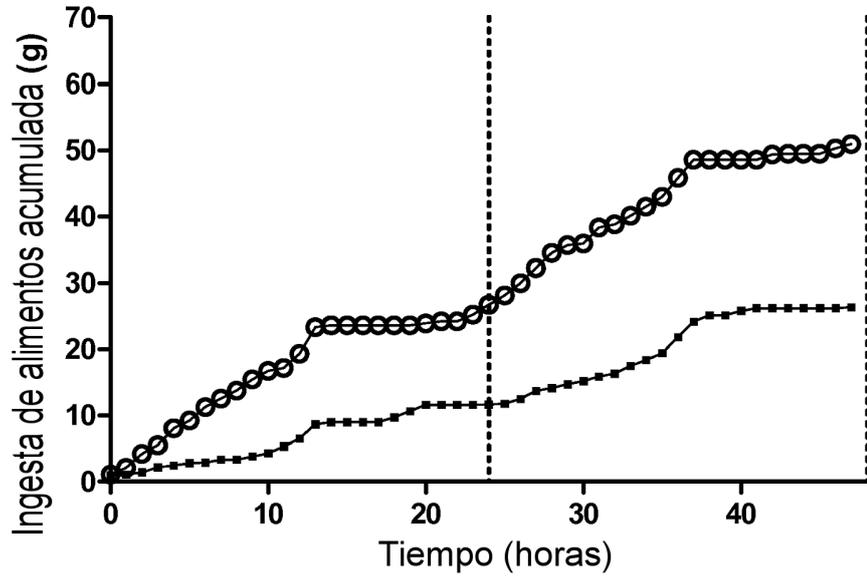


Figura 39b

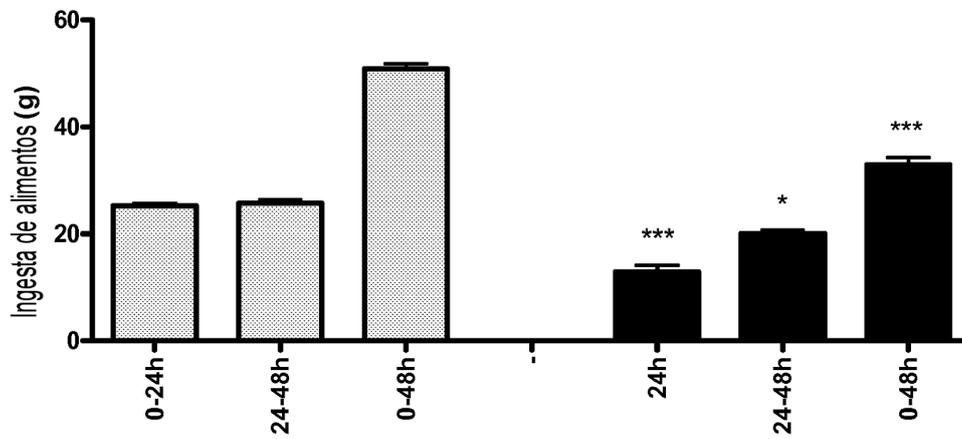


Figura 40a

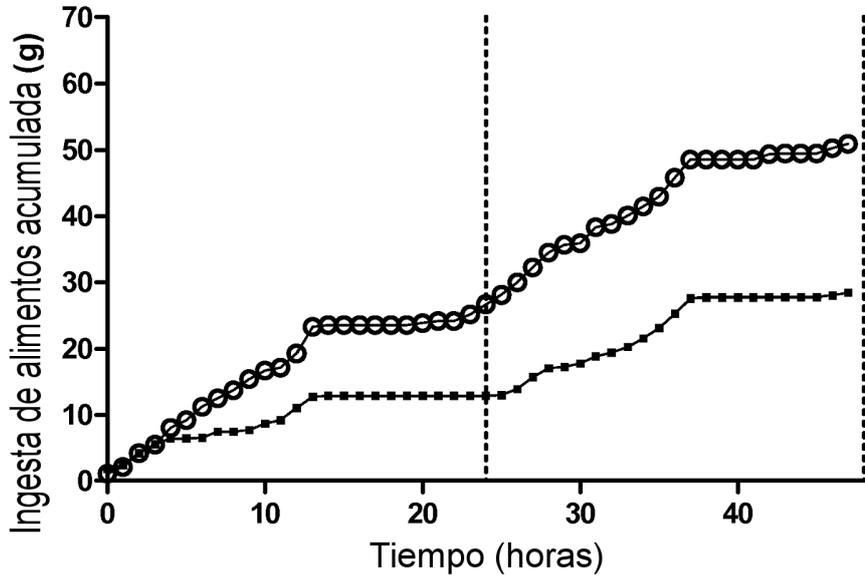


Figura 40b

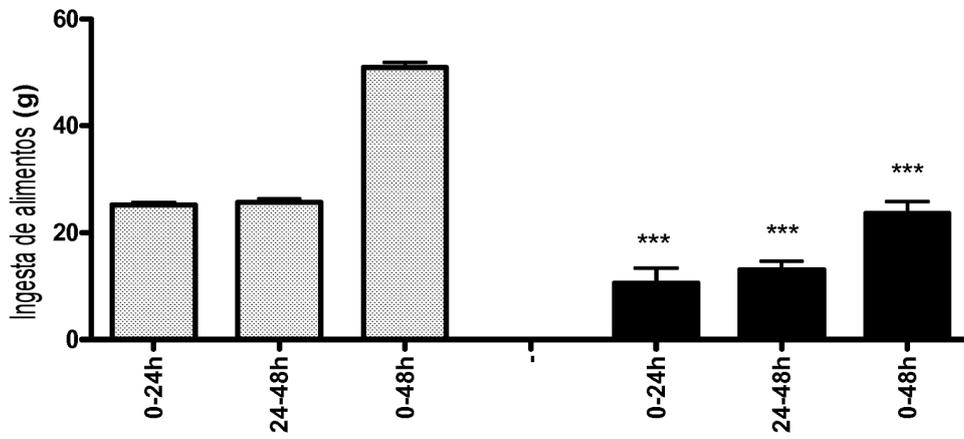


Figura 41a

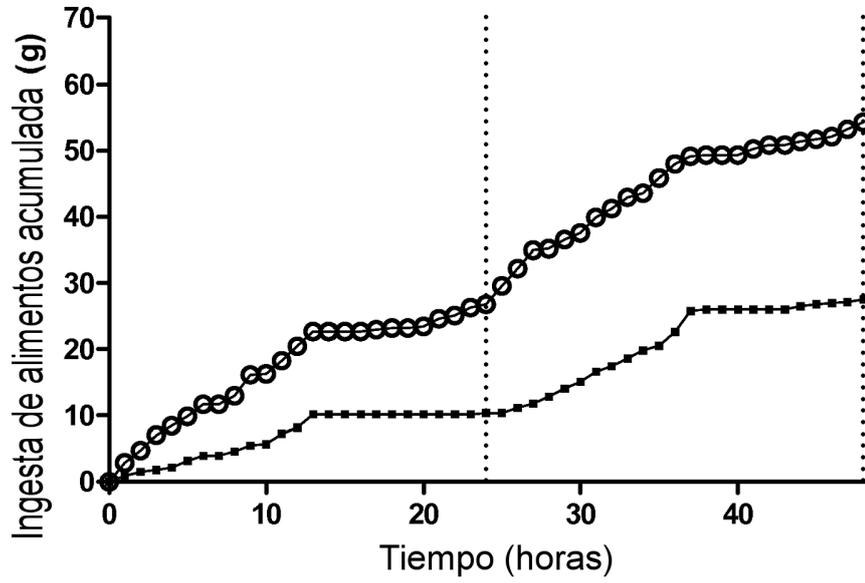


Figura 41b

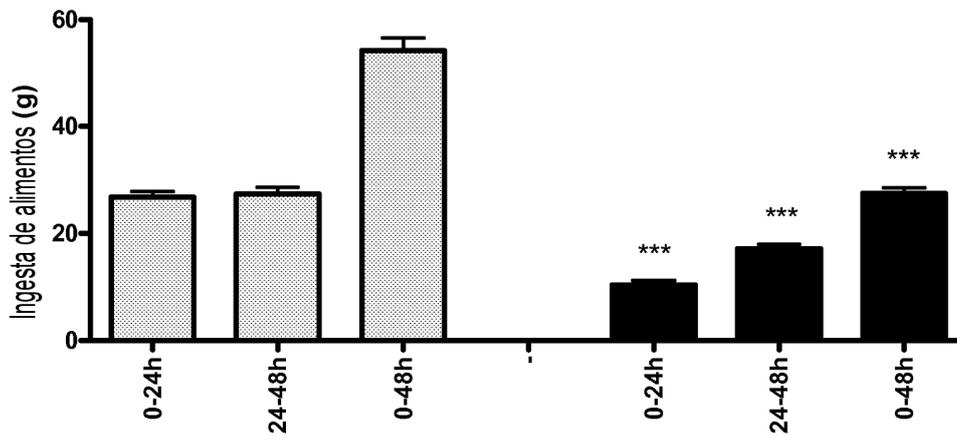


Figura 42a

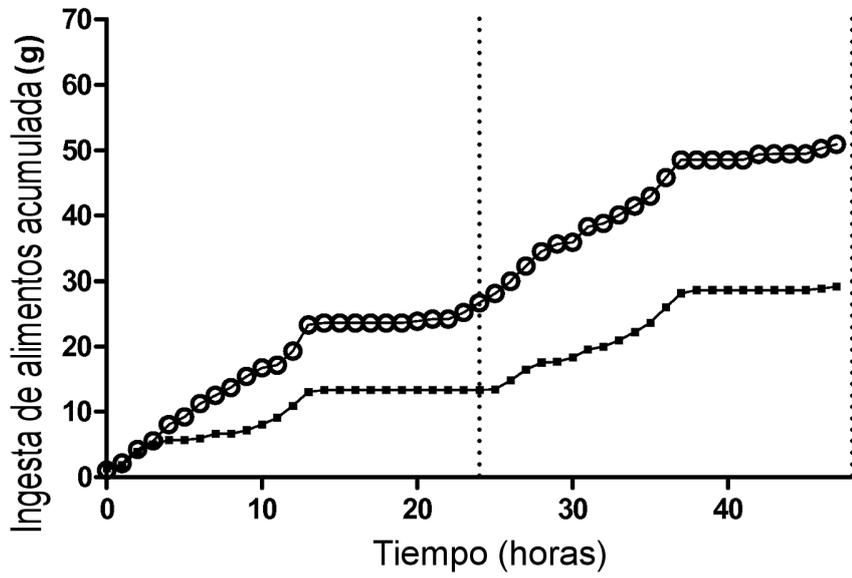


Figura 42b

