(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 721**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2014 PCT/EP2014/074477**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15071356**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2014 E 14802834 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3068795**

(54) Título: **hPYY (1-36) con sustitución de beta-homoarginina en la posición 35**

(30) Prioridad:

15.11.2013 EP 13193080
19.11.2013 US 201361906022 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

ØSTERGAARD, SØREN;
FRIEBOES, KILIAN WALDEMAR CONDE;
WIECZOREK, BIRGIT;
THOMSEN, JENS KAALBY y
WULFF, BIRGITTE SCHJELLERUP

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 727 721 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

hPYY (1-36) con sustitución de beta-homoarginina en la posición 35

Campo técnico

La presente invención se refiere a análogos y/o derivados del péptido yy (pyy), y su uso farmacéutico.

Incorporación como referencia del listado de secuencias

El listado de secuencias, titulado "listado de secuencias", de 25 054 bytes, se creó el 12 de noviembre de 2013 y se incorpora en la presente como referencia.

Antecedentes de la invención

El PYY se libera durante una comida a partir de las células L en el intestino delgado distal y el colon. Se conoce que el PYY tiene efectos periféricos en el tracto gastrointestinal (GI) y que además actúa centralmente como una señal de saciedad. El PYY se secreta naturalmente como un péptido de 36 aminoácidos (PYY(1-36)) con una amida C-terminal pero se escinde a PYY(3-36) que constituye aproximadamente el 50 % del PYY circulante. La enzima responsable de la degradación es la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). El PYY(3-36) se elimina rápidamente por proteasas y otros mecanismos de aclaramiento. Se ha informado que la vida media del PYY(3-36) es <30 minutos en cerdos (Ito T y otros, Journal of Endocrinology (2006), 191, pp113-119). Por lo tanto, PYY muestra propiedades farmacocinéticas subóptimas, lo que significa que el péptido debe administrarse al menos dos veces al día.

Mientras que PYY(1-36) activa los receptores Y1, Y2 y Y5 con muy poca selectividad y al receptor Y4 ligeramente menos, el PYY(3-36) procesado por DPP IV muestra una mayor selectividad por el receptor Y2 sobre los receptores Y1, Y4 y Y5, aunque se retiene cierta afinidad por Y1 y Y5. Se conoce que la activación del receptor Y2 disminuye el apetito y la ingesta de alimentos mientras que la activación de los receptores Y1 y Y5 conduce a un aumento en el apetito y la ingesta de alimentos. Además, la activación de los receptores Y1 y Y5 puede conducir a un aumento en la presión arterial.

Se ha sugerido el uso de PYY(3-36) en el tratamiento de la obesidad y enfermedades asociadas en base a los efectos demostrados de algunos de estos péptidos en modelos animales y en el hombre, y al hecho de que las personas obesas tienen niveles basales bajos de PYY así como también menores respuestas de este péptido a las comidas. Además, se ha demostrado que los agonistas de Y2 tienen efectos antisecretores y proabsortivos en el tracto gastrointestinal (GI). Se ha sugerido el uso potencial de agonistas de Y2 en el tratamiento de una serie de trastornos gastrointestinales.

En base a los efectos demostrados en, por ejemplo, ratas Zucker y ratones obesos inducidos por dieta (DIO) los análogos de PYY(3-36) selectivos para Y2 tienen un efecto positivo sobre el metabolismo de la glucosa y por lo tanto se sugiere su uso para el tratamiento de la diabetes (van den Hoek A. y otros, Am J Physiol Endocrinol Metab (2006), 292, ppE238-E245; y Ortiz A. y otros The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (2007), 323, pp 692-700).

El documento WO 2009/138511 A1 se refiere a agonistas del receptor Y2 y/o Y4 de acción prolongada. El documento WO 2011/033068 A1 se refiere a análogos de PYY estabilizados contra la ruptura proteolítica en el C-terminal. El documento WO 2011/058165 A1 se refiere a agonistas del receptor Y2 con propiedades farmacocinéticas extendidas.

Para el tratamiento de afecciones sensibles a la modulación del receptor Y tales como la obesidad y la diabetes sería atractivo usar análogos de PYY que sean específicos para el subtipo Y2 del receptor Y y lo que es más importante que muestren propiedades farmacocinéticas extendidas y como tal puedan usarse en un régimen de dosificación con menor frecuencia de administración que PYY o PYY(3-36).

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a compuestos de PYY que comprenden beta-homoarginina en la posición correspondiente a la posición 35 del PYY(1-36) humano (hPYY(1-36), SEQ ID NO:1).

Además o alternativamente, en un aspecto, los compuestos de PYY comprenden además una lisina en la posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36), y un grupo modificador unido al grupo épsilon amino de esta lisina.

En un aspecto, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos de PYY y excipientes farmacéuticamente aceptables, así como también al uso médico de los compuestos de PYY.

Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY que son agonistas del receptor Y2.

Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY que muestran selectividad hacia el subtipo Y2 del receptor Y en comparación con los subtipos Y1, Y4 y Y5 del receptor Y.

Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY con un tiempo de vida media más prolongado que el tiempo de vida media de hPYY(3-36). Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY con un tiempo de vida media más prolongado que el tiempo de vida media de hPYY(1-36).

Descripción de la invención

La invención se refiere a compuestos de PYY. Los compuestos de PYY de la presente invención tienen el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 35 de hPYY(1-36) sustituido con beta-homoarginina.

Además o alternativamente, en un aspecto, los compuestos de PYY comprenden además una lisina en la posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36), y un grupo modificador unido al grupo épsilon amino de esta lisina.

Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY que son agonistas del subtipo Y2 del receptor Y.

Además o alternativamente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de PYY que muestran selectividad hacia el subtipo Y2 del receptor Y en comparación con los subtipos Y1, Y4 y Y5 del receptor Y.

En un aspecto los péptidos que son "selectivos" para receptores específicos sobre otros receptores se refieren a péptidos que muestran al menos 10 veces, tal como al menos 20 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces mayor potencia para un receptor Y sobre otros receptores Y como se mide *in vitro* en un ensayo de función del receptor, tal como un ensayo de potencia funcional Actone, y se compara por los valores de EC50, o un ensayo de centelleo por proximidad (SPA) que mide la afinidad de unión al receptor, y se compara por los valores de Ki.

En lo siguiente, las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc.

Compuestos de PYY

El término "hPYY(1-36)" como se usa en la presente se refiere al péptido YY humano, cuya secuencia se incluye en el listado de secuencias como la SEQ ID NO:1. El péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1 también puede designarse como hPYY nativo.

El término "compuesto de PYY" como se usa en la presente se refiere a un péptido, o un compuesto, que es una variante de hPYY(1-36). El término "compuesto de PYY" como se usa en la presente puede referirse además a un péptido, o un compuesto, que es una variante de hPYY(3-36) (SEQ ID NO:2).

El término "compuesto de PYY" como se usa en la presente puede referirse además a un péptido, o un compuesto, que es una variante de hPYY(4-36).

El C-terminal de los compuestos de PYY de la presente invención es una amida, al igual que el C-terminal de hPYY(1-36) nativo (SEQ ID NO:1) y hPYY(3-36) (SEQ ID NO:2), respectivamente.

Los compuestos de PYY de la presente invención pueden ser análogos de PYY y/o sus derivados.

El término "análogo de PYY" se usa para los compuestos de PYY, donde está presente al menos una modificación de aminoácidos en la cadena principal.

El término "derivado de PYY" se usa para los compuestos de PYY que comprenden al menos un sustituyente que no es aminoácido unido covalentemente.

Un derivado de un análogo de PYY es por lo tanto un compuesto de PYY que comprende al menos una modificación de aminoácido y al menos un sustituyente que no es aminoácido unido covalentemente.

Los compuestos de PYY de la presente invención pueden comprender hasta 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).

El término "modificación de aminoácido" usado a lo largo de esta solicitud se usa en el significado de una modificación de un aminoácido en comparación con hPYY(3-36). Esta modificación puede ser el resultado de una

deleción de un aminoácido, adición de un aminoácido, sustitución de un aminoácido con otro o un sustituyente unido covalentemente a un aminoácido del péptido.

Los compuestos de PYY de la invención comprenden L-beta-homoarginina (beta-homoArg) en la posición correspondiente a la posición 35 de hPYY(1-36), lo que significa que los compuestos de PYY de la invención pueden comprender hasta 9 modificaciones de aminoácidos además de esta modificación en la posición correspondiente a la posición 35 de hPYY(1-36).

Aún en otro aspecto, los péptidos PYY de la invención pueden exhibir al menos 70 %, 75 % u 80 % de identidad de secuencia con hPYY(3-36). A modo de ejemplo de un método para la determinación de la identidad de secuencia entre dos análogos los dos péptidos [beta-homoArg35]hPYY(3-36) y hPYY(3-36) se alinean. La identidad de secuencia del análogo [betahomoArg35] hPYY(3-36) con relación a hPYY(3-36) se proporciona mediante el número de residuos idénticos alineados menos el número de residuos diferentes dividido por el número total de residuos en hPYY(3-36). En consecuencia, en dicho ejemplo la identidad de secuencia es (34-1)/34.

Los compuestos de PYY o análogos de PYY de la invención pueden describirse en referencia a i) el número del residuo aminoacídico en hPYY(1-36) que corresponde al residuo aminoacídico que se cambia (es decir, la posición correspondiente en hPYY(1-36), y ii) el cambio real.

Lo que sigue es un ejemplo no limitante de nomenclatura de análogo adecuada. [beta-homoArg35]hPYY(3-36) designa un análogo del PYY(1-36) humano, en donde la arginina de origen natural en la posición 35 se ha sustituido con L-beta-homoarginina y la tirosina y prolina de origen natural en la posición 1 y 2, respectivamente, se han eliminado.

Lo que sigue es un ejemplo no limitante de nomenclatura de análogo adecuada. [beta-homoArg35]hPYY(3-36) designa un análogo del PYY(1-36) humano, en donde la arginina de origen natural en la posición 35 se ha sustituido con beta-homoarginina y la tirosina y prolina de origen natural en la posición 1 y 2, respectivamente, se han eliminado.

Lo que sigue es un ejemplo no limitante de nomenclatura adecuada para un derivado de un análogo de PYY. 7-N{Épsilon} -[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]-etoxi]acetil]-[Lys7,beta-homoArg35]hPYY(3-36) designa un derivado de un análogo del PYY(3-36) humano, en donde [Lys7,beta-homoArg35] designa los cambios de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36) (SEQ ID NO:2), y en donde el sustituyente [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- se une al grupo épsilon amino de la lisina en la posición correspondiente a la posición 7 en hPYY(1-36).

Las expresiones “una posición equivalente a” o "posición correspondiente" pueden usarse para caracterizar el sitio de cambio en una variante de secuencia de PYY en referencia a hPYY(1-36).

En general a lo largo de la solicitud, cuando se hace referencia a una posición particular de un análogo de PYY, la posición referida es la posición del análogo de PYY correspondiente a esa posición particular de hPYY(1-36).

La expresión usada a lo largo de esta solicitud, que un compuesto de PYY comprende un aminoácido particular en una posición correspondiente a una posición determinada de hPYY(1-36), significa que el aminoácido nativo en esa posición se ha reemplazado con ese aminoácido particular.

Los residuos aminoacídicos pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra, y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son totalmente equivalentes.

Los análogos “que comprenden” determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, en comparación con hPYY(1-36). En un aspecto, el análogo "tiene" los cambios especificados.

Análogos de PYY

Un análogo de PYY es un péptido PYY en el que se ha modificado un número de residuos aminoacídicos en comparación con hPYY(1-36). Estas modificaciones incluyen sustituciones, inserciones, y/o deleciones, solas o en combinación.

En un aspecto específico, los análogos de PYY de la invención incluyen una o más modificaciones de un residuo aminoacídico "no esencial". En el contexto de la invención, un residuo aminoacídico "no esencial" es un residuo que puede alterarse, es decir, eliminarse o sustituirse en la secuencia de aminoácidos del PYY humano sin suprimir o reducir sustancialmente la actividad del análogo de PYY hacia el receptor Y2.

Sustituciones. En un aspecto los aminoácidos pueden sustituirse por sustitución conservadora. El término "sustitución conservadora" como se usa en la presente denota que uno o más aminoácidos se reemplazan por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos incluyen la sustitución de residuos aminoacídicos con características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos aromáticos.

En un aspecto, los análogos de PYY de la invención pueden comprender sustituciones de uno o más aminoácidos no naturales y/o que no son aminoácidos, por ejemplo, miméticos de aminoácidos, en la secuencia de PYY.

Deleciones y truncamientos. En un aspecto, los análogos de PYY de la invención pueden tener uno o más residuos aminoacídicos eliminados de la secuencia de aminoácidos del PYY humano, solos o en combinación con una o más inserciones o sustituciones.

Inserciones. En un aspecto, los análogos de PYY de la invención pueden tener uno o más residuos aminoacídicos insertados en la secuencia de aminoácidos del PYY humano, solos o en combinación con una o más deleciones y/o sustituciones.

En un aspecto, los análogos de PYY de la invención pueden incluir inserciones de uno o más aminoácidos no naturales y/o que no son aminoácidos en la secuencia de PYY.

El péptido PYY puede derivarse de vertebrados, tales como ser humano, ratón, oveja, cabra, vaca, o caballo. El término "vertebrado" significa miembros del subfilo Vertebrata, una división principal del filo Chordata que incluye los peces, anfibios, reptiles, aves, y mamíferos, todos los cuales se caracterizan por una columna vertebral segmentada y una cabeza bien diferenciada. El término "mamífero" significa seres humanos así como también otros miembros de sangre caliente del reino animal que poseen un mecanismo homeostático en la clase Mammalia, por ejemplo, mamíferos de compañía, mamíferos de zoológico, y mamíferos como fuente alimenticia. Algunos ejemplos de mamíferos de compañía son los caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos) y caballos; algunos ejemplos de mamíferos como fuente alimenticia son cerdos, ganado vacuno, ovejas y similares. En un aspecto el mamífero es un ser humano o un mamífero de compañía. En un aspecto el mamífero es un ser humano, varón o hembra.

El término “péptido”, como se usa, por ejemplo, en el contexto de los compuestos de PYY de la invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados por enlaces amida (o peptídicos).

Los péptidos de PYY de la invención comprenden al menos 25 aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. En modalidades particulares los péptidos PYY comprenden al menos 33 aminoácidos. En modalidades particulares los péptidos PYY comprenden al menos 34 aminoácidos.

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amina y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, frecuentemente referidos como una cadena lateral.

El término "aminoácido" incluye los aminoácidos proteinogénicos (o naturales) (entre los 20 aminoácidos estándar), así como también los aminoácidos no proteinogénicos (o no naturales). Los aminoácidos proteinogénicos son los que se incorporan naturalmente en las proteínas. Los aminoácidos estándar son los codificados por el código genético. Los aminoácidos no proteinogénicos no se encuentran en proteínas, o no se producen por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haberse sometido a modificación postraduccional). Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinogénicos son Aib (ácido a-aminoisobutírico), beta-homoArg (L-beta-homoarginina), así como también los isómeros D de los aminoácidos proteinogénicos.

En lo siguiente, debe entenderse que todos los aminoácidos del compuesto de PYY para los cuales no se establece el isómero óptico se refieren al isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

Derivados de PYY

El término "derivado” como se usa en la presente en el contexto de un péptido o análogo de PYY significa un péptido PYY modificado químicamente, en el que uno o más sustituyentes se han unido covalentemente al péptido.

En un aspecto de la invención, el sustituyente puede ser un sustituyente N-terminal.

Además o alternativamente, en un aspecto, el sustituyente puede ser un grupo modificador o alternativamente, referirse como porción de extensión.

Sustituyentes N-terminales

En un aspecto de la invención, el compuesto de PYY comprende un sustituyente unido covalentemente al grupo alfa-amino en el residuo aminoacídico en el N-terminal del compuesto de PYY. En un aspecto, los residuos

aminoacídicos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1-3 de hPYY(1-36) están ausentes, y el sustituyente N-terminal se une covalentemente al residuo aminoacídico en la posición correspondiente a la posición 4 de hPYY(1-36).

En un aspecto, el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi. En un aspecto, el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 12 átomos de carbono. En otro aspecto, el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 6 átomos de carbono.

Grupo modificador / Porción de extensión

En un aspecto, el compuesto de PYY comprende un grupo sustituyente o modificador unido covalentemente al residuo aminoacídico en la posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36). En un aspecto adicional, el grupo sustituyente o modificador es capaz de formar conjugados no covalentes con proteínas, lo que promueve de este modo la circulación del derivado con el torrente sanguíneo, y también tiene el efecto de extender el tiempo de acción del derivado, debido al hecho de que el conjugado del derivado de PYY y la albúmina se elimina solo lentamente por aclaramiento renal. Por lo tanto, el grupo sustituyente, o modificador, en su conjunto también puede referirse como una porción de extensión.

El grupo modificador puede unirse covalentemente a un residuo de lisina del péptido PYY por acilación, es decir, mediante un enlace amida formado entre un grupo de ácido carboxílico del grupo modificador y el grupo épsilon amino del residuo de lisina. El grupo amino de la lisina también podría acoplarse a un aldehído del grupo modificador mediante aminación reductora. En otro aspecto el grupo tiol de la cisteína podría acoplarse a un grupo maleiimido del grupo modificador por adición de Michael o acoplarse al grupo cloro- o yodoacetilo del grupo modificador por sustitución nucleofílica.

En un aspecto, el grupo modificador puede unirse covalentemente a un residuo de lisina en una posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36) por acilación, es decir, mediante un enlace amida formado entre un grupo de ácido carboxílico del grupo modificador y el grupo épsilon amino del residuo de lisina.

Los derivados de la invención pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas que tienen la misma fórmula molecular y la secuencia de átomos unidos, pero que difieren solo en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. El estereoisomerismo de los derivados ejemplificados de la invención se indica en la sección experimental, en los nombres así como también en las estructuras, con el uso de la nomenclatura estándar. A menos que se establezca de cualquier otra manera la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas del derivado reivindicado.

En un aspecto de la invención, debe entenderse que todos los aminoácidos del compuesto de PYY para los cuales no se establece el isómero óptico se refieren al isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

Sales farmacéuticamente aceptables

Los compuestos de PYY de la invención pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Las sales se forman, por ejemplo, mediante una reacción química entre una base y un ácido, por ejemplo: $2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$.

La sal puede ser una sal básica, una sal ácida, o puede ser de otro tipo (es decir, una sal neutra). Las sales básicas producen iones hidróxido y las sales ácidas iones hidronio en agua.

Las sales de los derivados de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos entre grupos aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos grupos pueden ubicarse en la porción peptídica, y/o en la cadena lateral de los derivados de la invención.

Los ejemplos no limitantes de los grupos aniónicos de los derivados de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en la cadena lateral, si los hay, así como también en la porción peptídica. La porción peptídica incluye frecuentemente grupos carboxílicos libres en los residuos aminoacídicos ácidos internos tales como Asp y Glu.

Los ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en la porción peptídica incluyen el grupo amino libre en el N-terminal, si está presente, así como también cualquier grupo amino libre de residuos aminoacídicos básicos internos tales como His, Arg y Lys.

Propiedades funcionales

En un primer aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención tienen una buena potencia para el receptor Y2. Además, o alternativamente, en un segundo aspecto, estos se unen muy bien al receptor Y2. Preferentemente

son agonistas totales del receptor Y2 como se refleja por su capacidad de unirse fuertemente al receptor Y2 combinada con la capacidad para activar totalmente el receptor en comparación con hPYY(1-36) y hPYY(3-36).

Además o alternativamente, en un segundo aspecto funcional, la invención se refiere a compuestos de PYY que muestran selectividad hacia el subtipo Y2 del receptor Y en comparación con los subtipos Y1, Y4 y Y5 del receptor Y.

Además, o alternativamente, en un tercer aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas. Además, o alternativamente, en un cuarto aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención tienen un aumento de la vida media y/o una disminución del aclaramiento. Además, o alternativamente, en un quinto aspecto funcional, estos tienen el efecto in vivo de disminuir la glucosa en sangre. Además, o alternativamente, en un sexto aspecto funcional, estos tienen el efecto in vivo de disminuir la ingesta de alimentos.

Actividad biológica - potencia in vitro

De acuerdo con el primer aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención son biológicamente activos, o potentes.

En una modalidad particular, potencia y/o actividad se refiere a la potencia in vitro, es decir el rendimiento en un ensayo funcional del receptor Y2, más en particular a la capacidad de activar el receptor Y2 humano.

El término concentración eficaz semimáxima (EC_{50}) generalmente se refiere a la concentración que induce la mitad de una respuesta entre el valor inicial y el máximo, en referencia a la curva de respuesta a dosis. EC_{50} se usa como una medida de la potencia de un compuesto y representa la concentración donde se observa el 50 % de su efecto máximo.

La potencia in vitro de los derivados de la invención puede determinarse como se describe en el Ejemplo 31 y determinarse la EC_{50} del derivado en cuestión. A menor valor de EC50, mejor la potencia.

En un aspecto, el derivado de la invención tiene una potencia in vitro determinada con el uso del método del Ejemplo 31 correspondiente a una EC_{50} de o inferior a 100 nM. En otro aspecto, el derivado de la invención tiene una potencia in vitro determinada con el uso del método del Ejemplo 31 correspondiente a una EC_{50} de o inferior a 50 nM. En otro aspecto, el derivado de la invención tiene una potencia in vitro determinada con el uso del método del Ejemplo 31 correspondiente a una EC_{50} de o inferior a 25 nM.

Actividad biológica - unión al receptor in vitro

De acuerdo con el segundo aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención se unen muy bien al receptor Y2. Esto puede determinarse como se describe en el Ejemplo 32.

Generalmente, la unión al receptor Y2 deberá ser tan buena como sea posible, correspondiente a un valor de Ki bajo. El valor de Ki se determina mediante la ecuación de Cheng-Prusuavif Ki=IC50/(1+[L]/Kd), en donde IC50 es la concentración inhibitoria semimáxima del agonista, [L] es la concentración del radioligando y Kd es la constante disociación para la unión.

A modo de ejemplo, en un aspecto, la afinidad de unión al receptor Y2 (Ki) es inferior a 100 nM. En un aspecto, la afinidad de unión al receptor Y2 (Ki) es inferior a 50 nM. En un aspecto, la afinidad de unión al receptor Y2 (Ki) es inferior a 10 nM.

Actividad biológica - farmacología in vivo

En otra modalidad particular los compuestos de PYY de la invención son potentes in vivo, lo que puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como también en ensayos clínicos.

El ratón diabético db/db es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y el efecto de reducción de la glucosa en sangre puede determinarse en tales ratones in vivo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 34.

Además, la inhibición de la ingesta de alimentos en los ratones db/db es un modelo adecuado para la determinación del efecto sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal como también se describe en el Ejemplo 34.

Generalmente, el efecto de reducción de la glucosa de una dosis de 1 umol/kg deberá ser tan bueno como sea posible correspondiente a un % de nivel de glucosa relativo bajo.

A modo de ejemplo, en un aspecto particular de la invención, 16 horas después de la dosificación el % de nivel de glucosa relativo es inferior a 80 %. En un aspecto de la invención, 16 horas después de la dosificación el % de nivel

de glucosa relativo es inferior a 70 %. En un aspecto de la invención, 16 horas después de la dosificación, el % de nivel de glucosa relativo es inferior a 60 %.

A modo de ejemplo, en un aspecto particular de la invención, 16 horas después de la dosificación el % de ingesta de alimentos relativo es inferior a 40 %. En un aspecto de la invención, 16 horas después de la dosificación el % de ingesta de alimentos relativo es inferior a 30 %. En un aspecto de la invención, 16 horas después de la dosificación el % de ingesta de alimentos relativo es inferior a 20 %.

Perfil farmacocinético

De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los compuestos de PYY de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas tales como aumento de la vida media terminal y/o disminución del aclaramiento.

El aumento de la vida media terminal y/o la disminución del aclaramiento significa que el compuesto en cuestión se elimina de manera más lenta del cuerpo. Para los compuestos de la invención esto implica una duración prolongada del efecto farmacológico.

Las propiedades farmacocinéticas de los derivados de la invención pueden determinarse de manera adecuada in vivo en estudios farmacocinéticos (PK). Tales estudios se realizan para evaluar cómo los compuestos farmacéuticos se absorben, distribuyen, y eliminan en el cuerpo, y cómo estos procesos afectan la concentración del compuesto en el cuerpo, en el transcurso del tiempo.

En el descubrimiento y la fase preclínica del desarrollo farmacéutico de fármacos, los modelos animales tales como el ratón, rata, mono, perro, o cerdo, pueden usarse para realizar esta caracterización. Cualquiera de estos modelos puede usarse para probar las propiedades farmacocinéticas de los derivados de la invención.

El cálculo de la vida media terminal y/o el aclaramiento es relevante para la evaluación de regímenes de dosificación y un parámetro importante en el desarrollo de fármacos, en la evaluación de nuevos compuestos farmacológicos.

Perfil farmacocinético - vida media in vivo en minicerdos

De acuerdo con el tercer aspecto funcional, los derivados de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas.

En una modalidad particular, las propiedades farmacocinéticas pueden determinarse como la vida media terminal ($T_{½}$) in vivo en minicerdos después de la administración i.v., por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 33 en la presente.

En un aspecto de la invención, la vida media terminal en minicerdos es de al menos 10 horas. En un aspecto de la invención, la vida media terminal en minicerdos es de al menos 20 horas. Aún en otro aspecto de la invención, la vida media terminal en minicerdos es de al menos 40 horas.

Producción de compuestos de pyy

La producción de péptidos como los compuestos de PYY de la presente invención se conoce bien en la técnica.

La porción PYY de los derivados de la invención puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis peptídica clásica, por ejemplo, síntesis peptídica en fase sólida con el uso de química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, ver, por ejemplo, Greene y Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza Dörwald, “Organic Synthesis on solid Phase”, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000, y “Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis”, editado por W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000.

Además, o alternativamente, pueden producirse mediante métodos recombinantes, a saber, mediante el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el péptido en un medio de nutrientes adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido. Los ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas para la expresión de estos péptidos son: Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, así como también, líneas celulares BHK o CHO de mamíferos.

Los compuestos de PYY de la invención que incluyen aminoácidos no naturales y/o sustituyentes unidos covalentemente pueden producirse, por ejemplo, como se describe en la parte experimental.

Los ejemplos específicos de métodos para preparar una serie de compuestos de PYY de la invención se incluyen en la parte experimental.

Purificación de proteínas

Los compuestos de PYY de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)), procedimientos electroforéticos, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, Editorial VCH, Nueva York, 1989).

Modo de administración

El término "tratamiento" pretende incluir tanto la prevención como la minimización de la enfermedad, trastorno, o afección a la que se hace referencia (es decir, "tratamiento" se refiere tanto a la administración profiláctica como terapéutica de los compuestos de PYY de la invención o composición que comprende los compuestos de PYY de la invención) a menos que se indique de cualquier otra manera o se contradiga claramente por el contexto.

La vía de administración puede ser cualquier vía que transporta eficazmente un compuesto de esta invención al lugar deseado o adecuado en el cuerpo, tal como por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Alternativamente, un compuesto de esta invención puede administrarse por vía oral, pulmonar, rectal, transdérmica, bucal, sublingual, o nasal.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones inyectables que comprenden compuestos de PYY de la presente invención pueden prepararse con el uso de técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según convenga para proporcionar el producto final deseado. Por lo tanto, de acuerdo con un procedimiento, un compuesto de PYY de esta invención se disuelve en un tampón adecuado a un pH adecuado de modo que la precipitación sea mínima o se evite. La composición inyectable se esteriliza, por ejemplo, mediante filtración estéril.

Una composición puede ser una formulación estabilizada. El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física y/o química aumentadas, preferentemente ambas. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

El término "estabilidad física" se refiere a la tendencia del polipéptido a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como resultado de la exposición al estrés termomecánico, y/o la interacción con interfases y superficies desestabilizantes (tales como superficies hidrofóbicas). La estabilidad física de una formulación acuosa de polipéptido se evaluó por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer a estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. Alternativamente, la estabilidad física puede evaluarse con el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional del polipéptido tal como, por ejemplo, Tioflavina T o sondas de “parches hidrofóbicos”.

El término "estabilidad química" se refiere a cambios químicos (en particular covalentes) en la estructura polipeptídica que conducen a la formación de productos de degradación química que tienen potencialmente una potencia biológica reducida, y/o efecto inmunogénico aumentado en comparación con el polipéptido intacto. La estabilidad química puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en diversos puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales, por ejemplo mediante SEC-HPLC, y/o RP-HPLC.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos de PYY con estabilidad física mejorada. En un aspecto, la invención proporciona compuestos de PYY con estabilidad química mejorada.

Tratamiento de combinación

El tratamiento con un compuesto de PYY de acuerdo con la presente invención puede combinarse además con una más sustancias activas farmacológicamente adicionales, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con la obesidad.

Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: agonistas del receptor de GLP-1, insulina, inhibidores de DPP-IV (peptidasa-IV), agonistas de amilina y agonistas del receptor de leptinas.

Indicaciones farmacéuticas

La presente invención se refiere además a un compuesto de PYY de la invención para el uso como un medicamento.

En aspectos particulares de la invención, los compuestos de PYY de la invención pueden usarse para los siguientes tratamientos médicos:

(i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como hiperglucemia, diabetes tipo 2, tolerancia a la glucosa alterada, diabetes tipo 1, diabetes no dependiente de insulina, MODY (diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes), diabetes gestacional y/o reducción de HbA1C;

(ii) retardo o prevención de la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión en la diabetes tipo 2, retardo de la progresión de la tolerancia a la glucosa alterada (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, retardo o prevención de la resistencia a la insulina, y/o retardo de la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;

(iii) mejorar la función de las células β, tal como disminuir la apoptosis de las células β, aumentar la función de las células β y/o la masa de células β, y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa de las células β;

(iv) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como la obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, reducción del peso corporal, supresión del apetito, inducción de saciedad; tratamiento o prevención del trastorno por atracón, bulimia nerviosa, y/u obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; reducción de la motilidad gástrica; retardo del vaciamiento gástrico; aumento de la movilidad física; y/o prevención y/o tratamiento de comorbilidades de la obesidad, tales como osteoartritis y/o incontinencia urinaria;

(v) prevención y/o tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como angiopatía; neuropatía, que incluye la neuropatía periférica; nefropatía; y/o retinopatía;

(vi) mejorar los parámetros lipídicos, tales como la prevención y/o tratamiento de la dislipidemia, reducción de los lípidos séricos totales; aumento de HDL; reducción de LDL densa y pequeña; reducción de VLDL; reducción de triglicéridos; reducción del colesterol; reducción de los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)) en un ser humano; inhibición de la generación de apolipoproteína a (apo(a)) in vitro y/o in vivo;

(vii) prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares; y/o

(viii) prevención y/o tratamiento de apnea del sueño.

Las siguientes indicaciones son preferidas particularmente: Diabetes tipo 2 y/u obesidad.

En un aspecto, en la presente se describe un método para alterar el metabolismo energético en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto de PYY de la invención, para alterar de este modo el gasto energético. La energía se consume en todos los procesos fisiológicos. El cuerpo puede alterar la tasa de gasto energético directamente, mediante la modulación de la eficiencia de esos procesos, o el cambio en el número y naturaleza de los procesos que se están produciendo. Por ejemplo, durante la digestión el cuerpo gasta energía al mover los alimentos a través del intestino, y al digerir los alimentos, y dentro de las células, la eficiencia del metabolismo celular puede alterarse para producir más o menos calor.

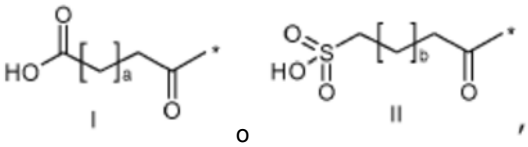
En un aspecto en la presente se describe un método para cualquiera y todas las manipulaciones de los circuitos precisos descritos en esta solicitud, que alteran la ingesta de alimentos de manera coordinada y recíprocamente alteran el gasto energético. El gasto energético es un resultado del metabolismo celular, la síntesis de proteínas, la tasa metabólica, y la utilización de calorías. Por lo tanto, en esta modalidad, la administración periférica da como resultado un aumento del gasto energético, y una disminución de la eficiencia de la utilización de calorías. En un aspecto, una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto de PYY de acuerdo con la invención se administra a un sujeto, para aumentar de este modo el gasto energético.

Si bien la "obesidad" se define generalmente como un índice de masa corporal por encima de 30, para los propósitos de esta descripción, cualquier sujeto, que incluye aquellos con un índice de masa corporal menor que 30, que necesita o desea reducir el peso corporal se incluye en el alcance de "obeso". Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que los efectos de los compuestos de PYY de la presente invención administrados periféricamente en la reducción de la ingesta de alimentos, en el retardo del vaciamiento gástrico, en la reducción de la disponibilidad de nutrientes, y en la causalidad de la pérdida de peso se encuentran determinados por las interacciones con una o más clases de receptores únicos en, o similares a, los de la familia PP. Más particularmente, parece que participa un receptor o receptores similares a los receptores que prefieren PYY (o Y2).

Modalidades particulares

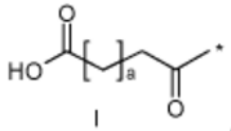
La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes de la invención:

1. Un compuesto de PYY que comprende L-beta-homoarginina en una posición correspondiente a la posición 35 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO:1), y una sal farmacéuticamente aceptable de este.
2. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 1, en donde el compuesto de PYY tiene un máximo de 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
3. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene un máximo de 8 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
4. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene un mínimo de 4 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
5. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene un mínimo de 6 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
6. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene un mínimo de 8 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
7. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene en el intervalo de 4 a 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
8. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene en el intervalo de 6 a 8 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
9. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene 6 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
10. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY tiene 8 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).
11. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY exhibe al menos 70 % de identidad de secuencia con hPYY(3-36).
12. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY exhibe al menos 75 % de identidad de secuencia con hPYY(3-36).
13. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY exhibe al menos 80 % de identidad de secuencia con hPYY(3-36).
14. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las posiciones correspondientes a la posición 1 y 2 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1) están ausentes.
15. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las posiciones correspondientes a la posición 1-3 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1) están ausentes.
16. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además arginina en una posición correspondiente a la posición 4 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
17. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además glutamina en una posición correspondiente a la posición 18 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
18. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además Aib en una posición correspondiente a la posición 22 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
19. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además alanina en una posición correspondiente a la posición 24 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
20. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además Aib en una posición correspondiente a la posición 24 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
21. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además triptófano en una posición correspondiente a la posición 30 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1).
22. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde las posiciones correspondientes a las posiciones 1-3 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1) están ausentes, y en donde el compuesto de PYY comprende además un sustituyente N-terminal, en donde el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 12 átomos de carbono.
23. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 22, en donde el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 10 átomos de carbono.
24. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 22, en donde el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 8 átomos de carbono.
25. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 22, en donde el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende hasta 6 átomos de carbono.
26. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 22, en donde el sustituyente N-terminal es un grupo alcoxi que comprende 6 átomos de carbono.
28. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 27, en donde el sustituyente N-terminal es 3-metilbutanoilo.
28. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que comprende además una lisina en una posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO: 1) y un grupo modificador unido al grupo épsilon amino del residuo de lisina en la posición 7, en donde dicho grupo modificador se define por A-B-C-, en donde A- comprende un ácido carboxílico o un ácido sulfónico.
29. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 28, en donde A- se selecciona de



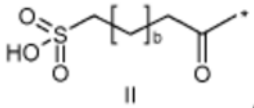
I o II ,

en donde a es un número entero de 12 a 19, y b es un número entero de 10 a 16, y en donde * denota el punto de unión a -B-.
30. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 29, en donde a es 15, y c es 13.
31. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 28, en donde A- es



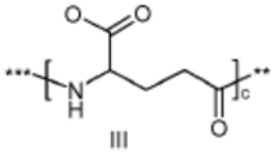
I ,

en donde a es un número entero de 12 a 19, y en donde * denota el punto de unión a -B-.
32. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 31, en donde a es 15.
33. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 29, en donde A- es



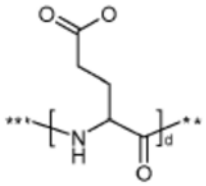
II ,

en donde b es un número entero de 10 a 16, y en donde * denota el punto de unión a -B-.
34. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 33, en donde b es 13.
35. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-34, en donde B- se selecciona de



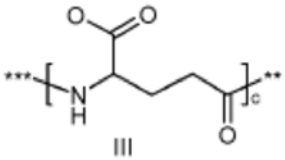
III ,

o



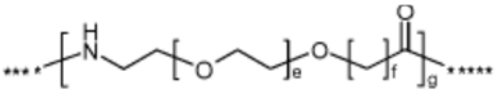
IV ,

en donde c es 1 o 2; y d es 1 o 2; y en donde *** denota el punto de unión a A-, y ** denota el punto de unión a -C-.
36. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 35, en donde B- es



III ,

en donde c es 1 o 2; y en donde *** denota el punto de unión a A-, y ** denota el punto de unión a -C-.
37. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-36, en donde -C- es



V ,

en donde e es un número entero en el intervalo de 1-5, f es un número entero en el intervalo de 1-5, g es un número entero en el intervalo de 2 a 6, y en donde **** denota el punto de unión a -B-, y ***** denota el punto de unión al grupo épsilon amino del residuo de lisina en la posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36).
38. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 37, en donde e y f son cada uno 1.
39. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 37-38, en donde g se selecciona de 2, 4 o 6.
40. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 39, en donde g es 2.
41. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 39, en donde g es 4.
42. Un compuesto de PYY de acuerdo con la modalidad 39, en donde g es 6.
43. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el compuesto de PYY no es una sal.
44. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores seleccionado de los siguientes:
[L-beta-arginina35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:3)

[L-beta-dihomoarginina35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:4)

[D-beta-homoarginina35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:5)

[beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:6)

[Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:7)

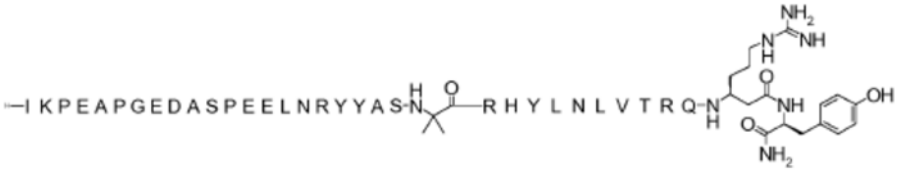
[Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:8)

[Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:9)

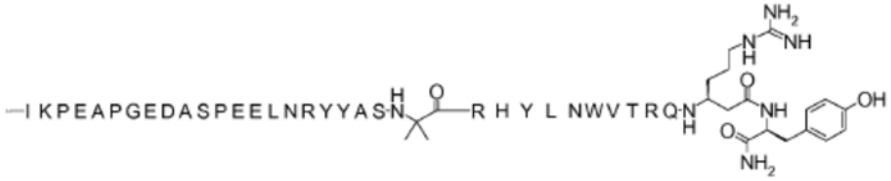
[Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:10)

[Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:11)

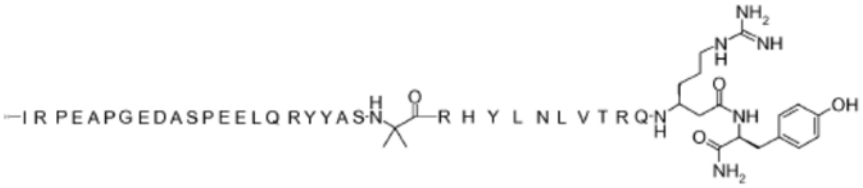
[Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:12)



[Aib24,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:13)

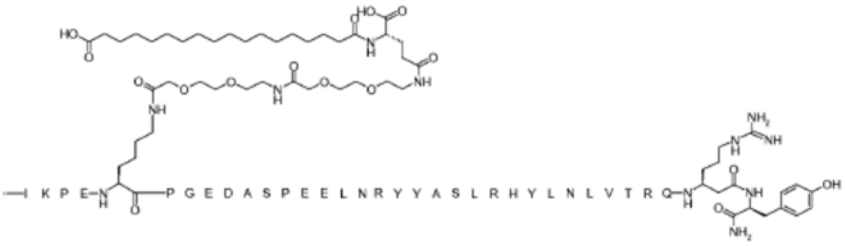


[Arg4,Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:14)

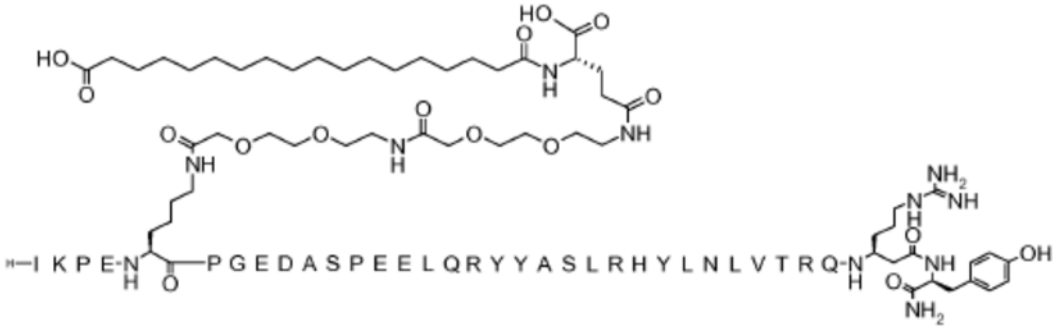


[Arg4,Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:15)

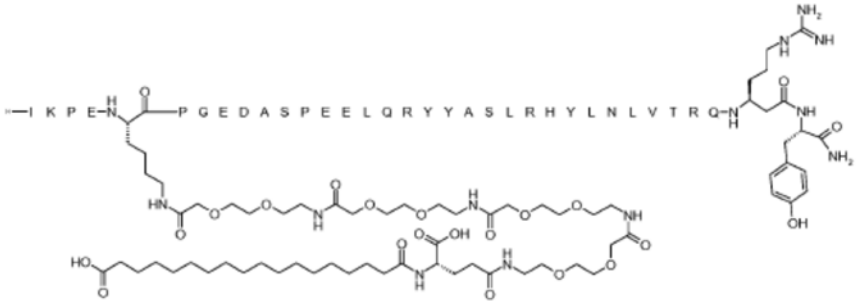
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:16)



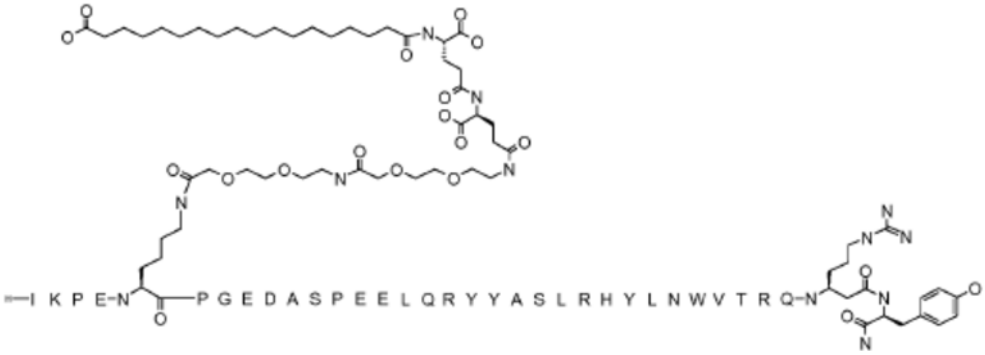
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:17)



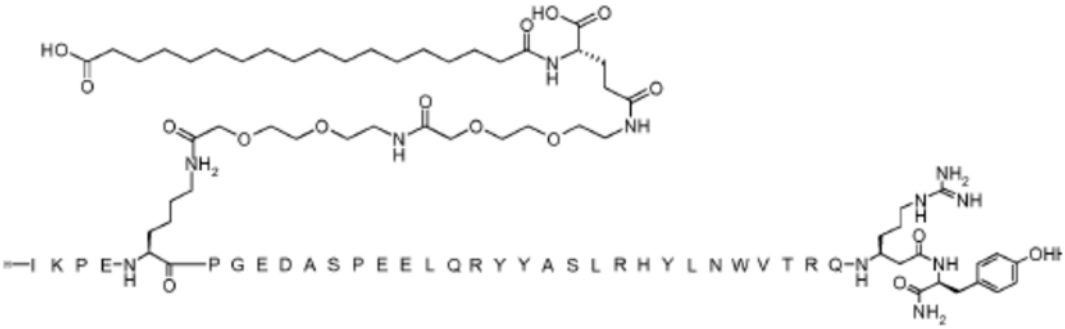
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil] -[Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:18)



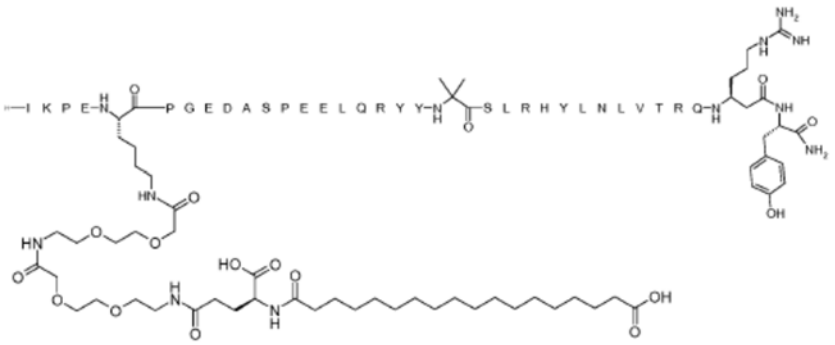
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35] hPYY(3-36) (SEQ ID NO:19)



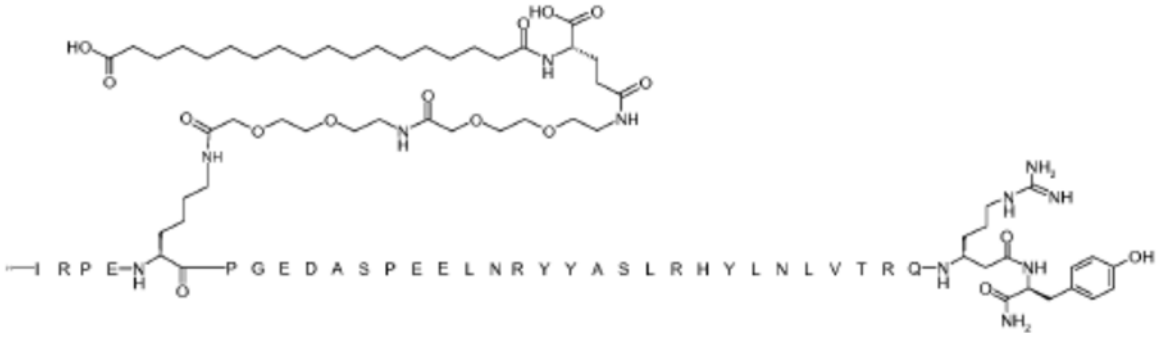
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:20)



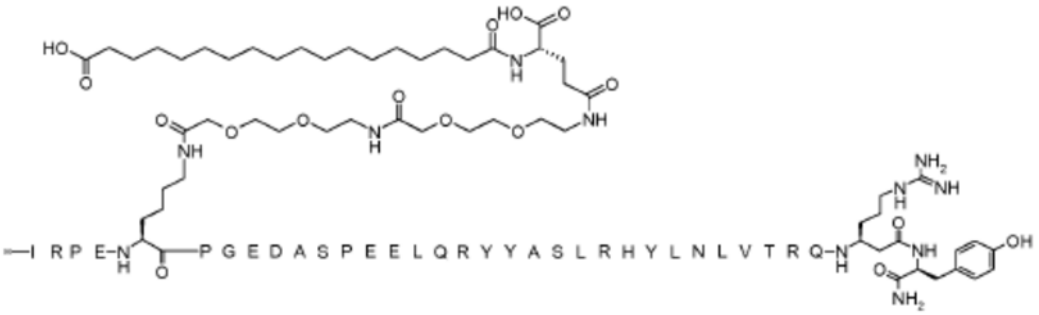
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Aib22, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:21)



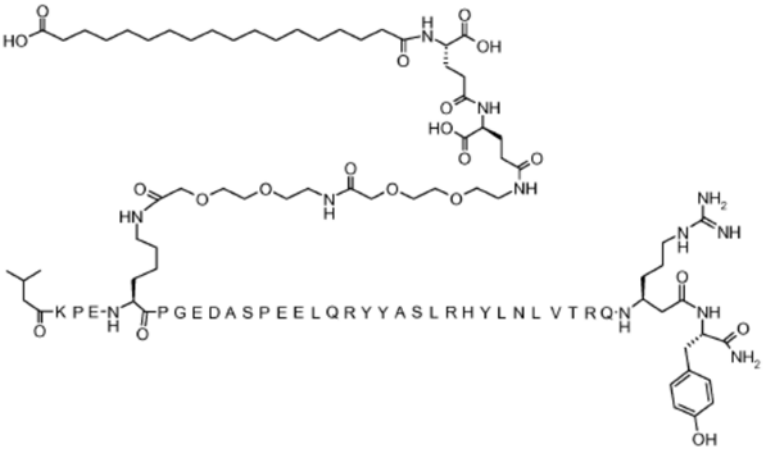
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:22)



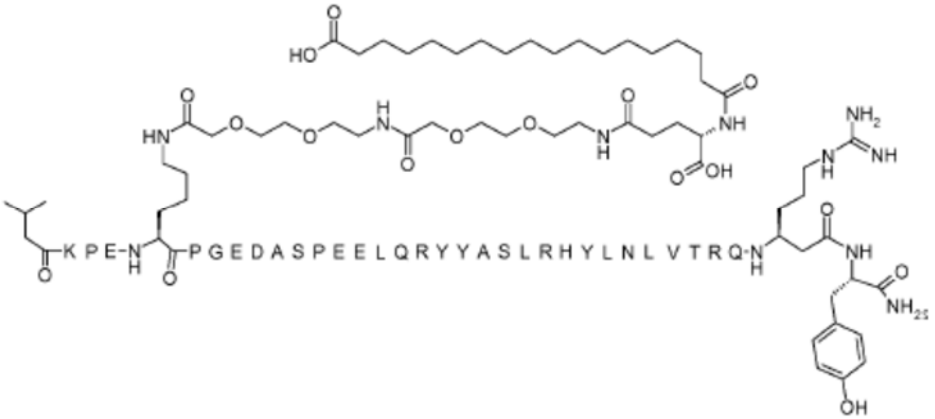
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:23)



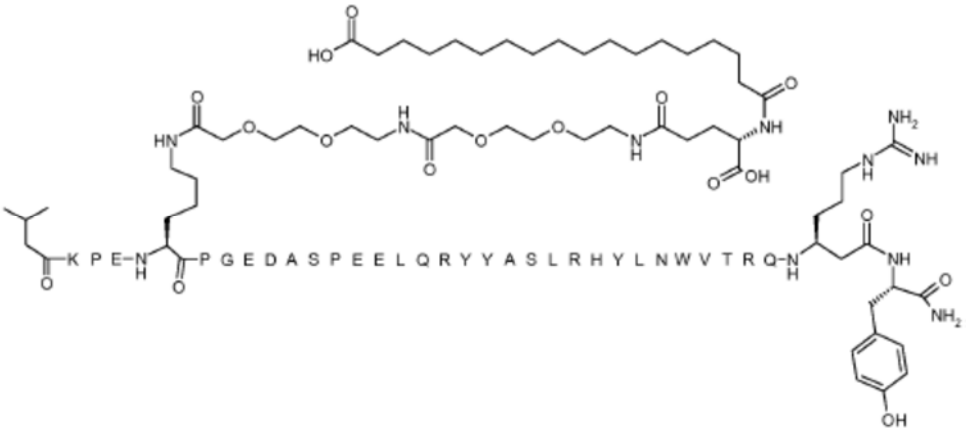
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]-amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:24)



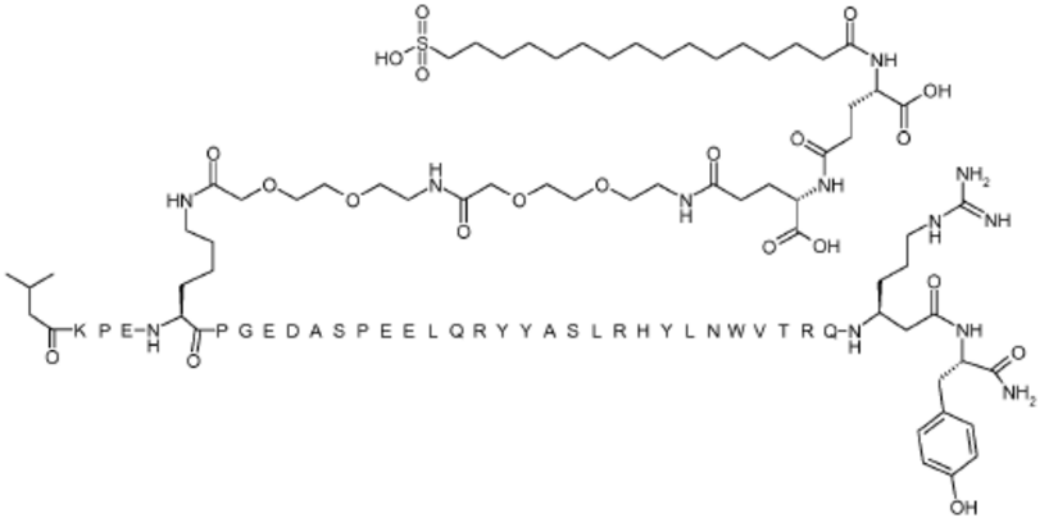
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino) butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:25)



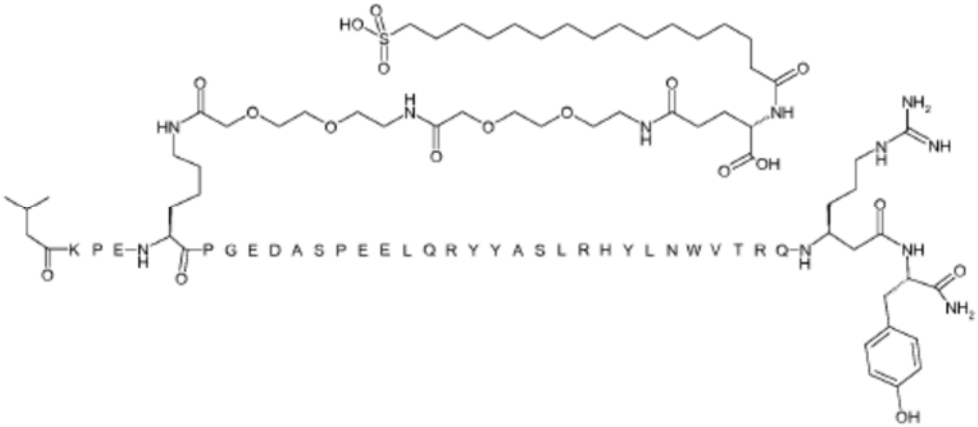
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:26)



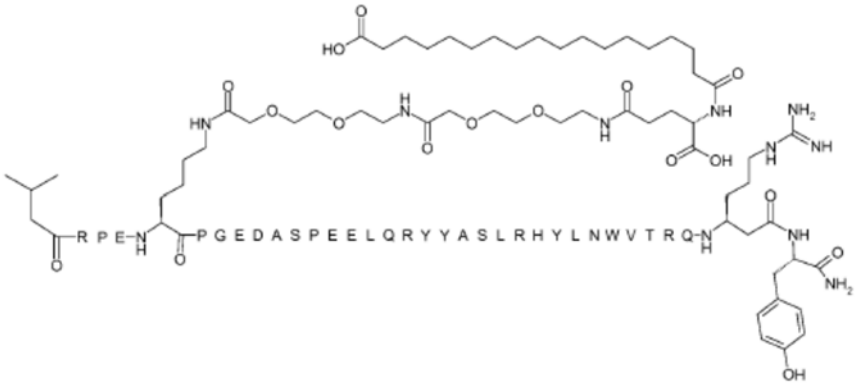
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:27)



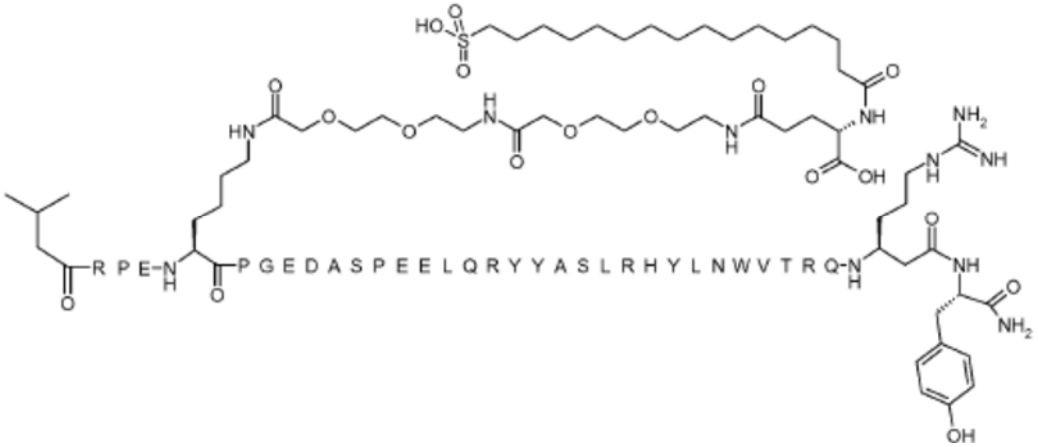
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:28)



4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:29)



4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:30)



45. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es un agonista del receptor Y2 humano.

46. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es un agonista total del receptor Y2 humano.

47. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es un agonista selectivo del receptor Y2 humano.

48. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es un agonista total selectivo del receptor Y2 humano.

49. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es capaz de activar el receptor Y2 humano.

50. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es capaz de activar el receptor Y2 humano en un ensayo con células completas que expresan el receptor Y2 humano.
51. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es capaz de activar el receptor Y2 humano en el ensayo de potencia funcional Actone del ejemplo 31.
52. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es capaz de unirse al receptor Y2 humano.
53. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que es capaz de unirse al receptor Y2 humano, en donde la unión al receptor Y2 humano se mide en un ensayo de unión competitiva, tal como el ensayo del ejemplo 32.
54. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que tiene propiedades farmacocinéticas mejoradas.
55. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que tiene un aumento de la vida media y/o una disminución del aclaramiento.
56. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que tiene el efecto in vivo de disminuir la glucosa en sangre determinado en un estudio de dosis única en un modelo de ratón db/db.
57. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores que tiene el efecto in vivo de disminuir la ingesta de alimentos determinado en un estudio de dosis única en un modelo de ratón db/db.
58. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-44, para el uso como un medicamento.
59. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-44, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimentarios, complicaciones diabéticas, enfermedades cardiovasculares y/o apnea del sueño; y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética.
60. El uso de un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-44, para el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimentarios, complicaciones diabéticas, enfermedades cardiovasculares y/o apnea del sueño; y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética.
61. Un método para el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimentarios, complicaciones diabéticas, enfermedades cardiovasculares y/o apnea del sueño; y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-44.

Ejemplos

Esta parte experimental comienza con una lista de abreviaturas, y le sigue a continuación una sección que incluye los métodos generales para sintetizar y caracterizar los compuestos de la invención. Después le sigue una serie de ejemplos que se refieren a la preparación de compuestos de PYY específicos, y al final se ha incluido una serie de ejemplos relacionados con la actividad y las propiedades de estos compuestos (sección titulada métodos farmacológicos).

Los ejemplos sirven para ilustrar la invención.

Lista de abreviaturas

Aib: ácido α-aminoisobutanoico
r.t: Temperatura ambiente
ACN: acetonitrilo
DIPEA: diisopropiletilamina
H_2O: agua
CH_3CN: acetonitrilo
DMF: N,N-dimetilformamida
Fmoc: 9 H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
Boc: terc butiloxicarbonilo
OtBu: éster terc butílico
tBu: terc butilo
Trt: trifenilmetilo
Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio
HFIP: Hexafluoroisopropanol
Mtt: 4-metiltritilo
DCM: diclorometano
TIPS: triisopropilsilano
TFA: ácido trifluoroacético
Et2O: éter dietílico
NMF: 1-Metil-formamida

NMP: 1-Metil-pirrolidin-2-ona
DIPEA: Diisopropiletilamina
HOAc: ácido acético
HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt: 1-Hidroxibenzotriazol
DIC: Diisopropilcarbodiimida
Min: minutos
MW: Peso molecular
HMWP: Proteínas de alto peso molecular
beta-homoArg: L-beta-homoarginina

Materiales y Métodos

Métodos generales de preparación

Esta sección se refiere a métodos para la síntesis en fase sólida de la cadena principal peptídica y la síntesis de la cadena lateral unida a la cadena principal (métodos de SPPS, que incluyen métodos para el acoplamiento de aminoácidos, la desprotección de Fmoc-aminoácidos, métodos para escindir el péptido de la resina, y para su purificación).

1. Síntesis de la cadena principal peptídica protegida unida a la resina

Procedimiento para el ensamblaje gradual automatizado de la cadena principal peptídica. La resina con peptidilo protegido se sintetizó de acuerdo con la estrategia Fmoc en un sintetizador de péptidos en fase sólida Prelude (Protein Technologies, Tucson, Estados Unidos) ya sea a escala de 0,25 mmol o de 0,4 mmol con el uso de los protocolos de la máquina suministrados por el fabricante. Los derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc usados fueron el estándar recomendado: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, o, Fmoc-Val-OH etc. suministrados, por ejemplo, por Bachem, Iris Biotech, Protein Technologies o Novabiochem. Si no se especifica nada más se usa la forma L natural de los aminoácidos. El acoplamiento se realizó mediante el uso de acoplamientos mediados por DIC (diciclohexilcarbodiimida) y Ozyma Pure (2-ciano-2-(hidroxiimino)-acetato de etilo, Merck, Novabiochem, Suiza) en NMP (N-metil pirrolidona). El acoplamiento del Fmoc-aminoácido se realizó como se describió anteriormente con el uso de un exceso de 4-8 veces de aminoácido con relación a la sustitución de resina (4-8 eq). El tiempo de acoplamiento estuvo en el intervalo de 1 hora hasta 4 horas. El Fmoc-Arg(pbf)-OH se acopló con el uso de un procedimiento de acoplamiento doble (1 hora + 1 hora). La resina usada para la síntesis de las amidas peptídicas puede ser Tentagel RAM (Rapp Polymere, Alemania), resina de amida de Rink ChemMatrix (Matrix Innovation, Canadá) resina de amida de Rink (Merck/Novabiochem). Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron Fmoc-aminoácidos estándar (suministrados, por ejemplo, por Protein Technologies, o Novabiochem. El grupo épsilon amino de la lisina a derivatizar se protegió con Mtt. El aminoácido o construcción N-terminal se acopló como un aminoácido protegido con Boc, por ejemplo, Boc-Ile. Alternativamente el ácido isovalérico se acopló de acuerdo con el procedimiento de acoplamiento descrito anteriormente para los Fmoc-aminoácidos. El ensamblaje gradual en fase sólida en el equipo Prelude se realizó con el uso de las siguientes etapas: 1) Desprotección (eliminación de Fmoc) mediante el uso de piperidina al 25 % en NMP durante 2x4 min., etapa 2) Lavado (eliminación de la piperidina) con NMP y DCM, etapa 3) Acoplamiento del Fmoc-aminoácido (Fmoc-aminoácido 0,3 M en Oxyma Pure 0,3 M en NMP) en exceso de 4-8 eq durante 1-4 horas de acoplamiento iniciado por la adición de 1/10 volumen de DIC 3 M en NMP y 1/10 volumen de colidina en NMP. La mezcla se realizó por burbujeo ocasional con nitrógeno, etapa 4) Lavado (eliminación del exceso de aminoácido y reactivos mediante el uso de NMP y DCM). La última etapa incluyó el lavado con DCM que preparó a la resina para la unión de la porción de unión a albúmina en la cadena lateral de la lisina.

2. Unión de grupos modificadores a la cadena principal peptídica protegida unida a la resina

Procedimiento para la eliminación manual de la protección con Mtt (lisina(Mtt): Antes de la síntesis del grupo modificador, debe eliminarse el grupo Mtt en el sitio de unión (lisina). La resina se colocó en una jeringa o matraz de reacción y se trató con 75 % de hexafluoroisopropanol (HFIP) + 25 % de DCM durante 2 X 30 min para eliminar el grupo Mtt. Después la resina se lavó con DCM y NMP como se describió anteriormente y se neutralizó con DIPEA al 5 % (etapa de neutralización) en NMP o piperidina al 25 % en NMP seguido de lavado con NMP antes de acoplar la porción de albúmina. Alternativamente, se omitió la etapa de neutralización.

Procedimiento para la eliminación por equipo Prelude de la protección con Mtt (Lisina(Mtt)): En el equipo Prelude la resina se trató con 75 % de hexafluoroisopropanol (HFIP) + 25 % de DCM durante 2 x 2 min seguido de 2 X 30 min para eliminar el grupo Mtt en la lisina. Después la resina se lavó con DCM y NMP seguido de una etapa de neutralización con el uso de piperidina al 25 % en NMP en 4 min, y después quedó preparada para la síntesis del grupo modificador.

Procedimiento para la síntesis manual de grupos modificadores sobre un residuo de lisina:

Los bloques de construcción de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, Fmoc-Glu-OtBu, y éster mono-tercbutílico de ácido eicosanodioico (núm. de CAS 843666-40-0) se acoplaron con el uso de DIC y Oxyma Pure en 4-8 eq con relación a la sustitución de resina. El tiempo de acoplamiento fue de 2-16 horas seguido usualmente de una etapa de protección con el uso de anhídrido acético 1 M durante 15-60 min. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 25 % en NMP durante 10-30 min. seguido de lavado. El ácido hexadecanoico 16-sulfónico se solubilizó en NMP o N-metilformamida (NMF) a 60 grados Celsius o más y se activó con PyBOP 1 eq con relación al ácido hexadecanoico sulfónico y se añadió además 2 eq de diisopropiletilamina (DIPEA) con relación al ácido hexadecanoico sulfónico. La resina con peptidilo se lavó con NMP o NMF caliente justo antes de la adición del ácido hexadecanoico sulfónico activado. Se usó un exceso de 3-4 del bloque de construcción sulfónico y se permitió el acoplamiento > 16 horas.

Procedimiento para la síntesis automatizada de grupos modificadores sobre un residuo de lisina:

Para la síntesis de los grupos modificadores se usaron los siguientes bloques de construcción: ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico, Fmoc-Glu-OtBu, y éster mono-terc-butílico de ácido eicosanodioico (núm. de CAS 843666-40-0). Los grupos modificadores se acoplaron con el uso de DIC y Oxyma Pure en 4-8 eq con relación a la sustitución de resina. El tiempo de acoplamiento fue de 2-16 horas seguido usualmente de una etapa de protección con el uso de anhídrido acético 1 M durante 20 min. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 25 % en NMP durante 2x4 min. seguido de lavado como se describió en la SPPS de la cadena principal peptídica. Todas las demás etapas de síntesis también fueron iguales a las descritas anteriormente con la síntesis de la cadena principal. El acoplamiento del ácido hexadecanoico 16-sulfónico se realizó mediante el procedimiento manual como se describió anteriormente con el uso de pyBOP como reactivo de acoplamiento.

3. Escisión del péptido unido a la resina con o sin grupos modificadores unidos y su purificación

Antes de la desprotección con TFA la resina con peptidilo se lavó con DCM o éter dietílico y se secó. El péptido y los grupos de protección de las cadenas laterales se eliminaron por adición de 20-40 ml (escala de 0,25 mmol) 30-60 ml (escala de 0,4 mmol) de 92 % de TFA, 5 % de TIPS y 3 % de H2O durante 2-4 horas. Después se filtró el TFA y en algunos casos se concentró con una corriente de argón y éter dietílico para precipitar el péptido. El péptido se lavó de tres a cinco veces con éter dietílico y se secó.

Métodos generales de detección y caracterización

Esta sección se refiere a métodos para la detección y caracterización de los péptidos resultantes, que incluyen los métodos de LCMS, MALDI y UPLC.

1. Método de LC-MS (LCMS1)

Se usó un espectrómetro de masas LC/MSD TOF de Agilent Technologies (G1969A) para identificar el peso molecular del péptido después de la elución de un sistema de HPLC de Agilent serie 1200. La deconvolución de los datos de masa se calculó con el uso del programa informático de Agilents. Eluyentes:

Tampón A: TFA al 0,1 % en agua
Tampón B: TFA al 0,1 % en CH_3CN

LC-MS Acquity de Waters (LCMS2)
Sistema de LC: UPLC Acquity de Waters
Columna: UPLC Acquity BEH de Waters, C-18, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm
Detector: LCT Premier XE de Waters (Micromasa)
Gradiente lineal: 5 % a 95 % de B
Tiempo de ejecución del gradiente: 4,0 minutos
Tiempo de ejecución total: 7,0 minutos
Velocidad de flujo: 0,4 ml/min
Temperatura de la columna: 40 °C
Solvente A: 99,90 % de agua MQ, 0,1 % de ácido fórmico
Solvente B: 99,90 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico

2. Métodos de UPLC

Método UPLC26v01

Tampón A: TFA al 0,05 %
Tampón B: CH3CN + TFA al 0,05 %
Flujo: 0,45 ml/min

Gradiente: 5-60 % de Tampón B (0,5 - 4 min.)
Columna: UPLC Acquity BEH C18 1,7 um, 2,1 x 50 mm
Temperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC29v01

Tampón A: TFA al 0,05 %
Tampón B CH3CN + TFA al 0,05 %
Flujo: 0,45 ml/min
Gradiente: 15-35 % de Tampón B (0,5 - 4 min.)
Columna: UPLC Acquity BEH C18 1,7 um, 2,1 x 50 mm
Temperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC30v01

Tampón A: TFA al 0,05 %
Tampón B: CH3CN + TFA al 0,05 %
Flujo: 0,45 ml/min
Gradiente: 20-40 % de Tampón B (0,5 - 4 min.)
Columna: UPLC Acquity BEH C18 1,7 um, 2,1 x 50 mm
Temperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC31v01

Tampón A: TFA al 0,05 %
Tampón B: CH3CN + TFA al 0,05 %
Flujo: 0,45 ml/min
Gradiente: 25-45 % de Tampón B (0,5 - 4 min.)
Columna: UPLC Acquity BEH C18 1,7 um, 2,1 x 50 mmTemperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC02v01

Sistema: Sistema UPLC Acquity de Waters
Tampón A: TFA al 0,05 % en H_2O
Tampón B: CH3CN + TFA al 0,05 %
Flujo: 0,40 ml/min
Gradiente: 5-95 % de Tampón B (16 min.)
Columna: UPLC Acquity BEH C18 1,7 um, 2,1 x 150 mm
Temperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC07v01

Sistema: Sistema UPLC Acquity de Waters
Tampón A: hidrógeno fosfato de diamonio 0,09 M (ac) y acetonitrilo al 10 %, pH 3,6
Tampón B: 20 % de isopropanol, 20 % de agua y 60 % de acetonitrilo
Flujo: 0,50 ml/min
Gradiente: 35-65 % de Tampón B (2-17 min.)
Columna: Columna Fenomenex Kinetex C18, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm
Temperatura de la columna: 60 °C

Método UPLC16v01

Sistema: Sistema UPLC Acquity de Waters
Tampón A: sulfato de sodio 0,2 M, hidrógeno fosfato de disodio 0,02 M, dihidrógeno fosfato de sodio 0,02 M, 90 % de agua y 10 % de acetonitrilo, pH 7,2
Tampón B: 70 % de acetonitrilo, 30 % de agua
Flujo: 0,40 ml/min
Gradiente: 20-50 % de Tampón B (3-20 min.)
Columna: columna UPLC ACQUITY BEH Shield RP18, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm
Temperatura de la columna: 60 °C

Método UPLC17v01

Sistema: Sistema UPLC Acquity de Waters
Tampón A: sulfato de sodio 0,2 M, hidrógeno fosfato de disodio 0,02 M, dihidrógeno fosfato de sodio 0,02 M, 90 % de agua y 10 % de acetonitrilo, pH 7,2

Tampón B: 70 % de acetonitrilo, 30 % de agua
Flujo: 0,40 ml/min
Gradiente por etapas: 10-20 % de B durante 3 minutos, después 20-80 % de B durante 17 minutos, después 80-90 % de B durante 1 minuto
Columna: columna UPLC ACQUITY BEH Shield RP18, 1,7 um, 2,1 mm x 150 mm
Temperatura de la columna: 60 °C

Método UPLC- AP-01

Tampón A: TFA al 0,1 % en H_2O
Tampón B: CH3CN + TFA al 0,1 %
Flujo: 0,40 ml/min
Gradiente: 5-95 % de Tampón B (16 min.)
Columna; UPLC Acquity BEH130; 150x 2,1; 1,7 um
Temperatura de la columna: 40 °C

Método UPLC- AP-02

Tampón A: Na2HPO4 20 mM, NaH2PO4 20 mM, Na2SO4 200 mM en 90 % de agua / 10 % de acetonitrilo, pH 7,20
Tampón B: 70 % de acetonitrilo/ 30 % de agua
Flujo: 0,40 ml/min
Gradiente: 10-20 % de Tampón B (0-3 min.); 20-50 % de Tampón B (3-20 min); 50-80 % (20-21 min)
Columna; UPLC Acquity BEH Shield, RP18 1,7 um, 2,1 x 150 mm
Temperatura de la columna: 40 °C

3. Método de MALDI-MS

Los pesos moleculares de los péptidos se determinaron con el uso de espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-MS) y se registraron en un equipo Microflex (Bruker). Se usó una matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxi cinámico. El peso molecular del producto se calculó en base al resultado del análisis MALDI-MS con el uso del software suministrado por el fabricante.

Síntesis de compuestos intermedios

Síntesis de ácido 16-sulfo-hexadecanoico

Se disolvió 16-hexadecanolida (997 g, 3,92 mol) en metanol (15,1 L) y se añadió ácido tolueno-4-sulfónico monohidratado (90,0 g, 0,473 mol). La mezcla de reacción se calentó en un reactor de 50 L a 55 °C durante 16 horas. Después de enfriar se añadió hidrógeno carbonato de sodio (56,0 g, 0,67 mol) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min. El solvente se evaporó en un evaporador giratorio Heidolph de 20 L. Se añadió acetato de etilo (12 L) y la mezcla se extrajo con solución de hidrógeno carbonato de sodio al 5 % (10 L). La capa orgánica se separó; la capa de emulsión se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 L), el material lodoso insoluble blanco se separó y la capa de acetato de etilo se lavó nuevamente con solución de hidrógeno carbonato de sodio al 5 % (5 L). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio (5 L) y salmuera (10 L). El solvente se evaporó en un evaporador giratorio Heidolph de 20 L. El producto crudo se cristalizó a partir de hexanos (8 L). La solución caliente en hexanos se decantó y después se dejó cristalizar en un baño de hielo. El material se filtró en frita grande y se lavó con hexanos fríos (2 L). El material puro se secó al vacío.

Rendimiento: 1062,2 g (95 %). R_F (SiO_2, diclorometano/metanol 95:5): 0,65.

^{1}H espectro de NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δH): 3,67 (s, 3 H); 3,67-3,60 (m, 2 H); 2,30 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,67-1,53 (m, 4 H); 1,25 (s, 22 H).

El éster anterior (957 g, 3,34 mol) se disolvió en diclorometano (7 L) en un evaporador giratorio Heidolph de 20 L. Se añadió trietilamina (695 ml, 4,98 mol), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C (poniendo hielo en el baño evaporador) y se añadió cloruro de metanosulfonilo (325 ml, 4,19 mol) en diclorometano (200 ml) lentamente durante 10 minutos mediante una tubería externa con el uso de un pequeño vacío. Después la mezcla de reacción se calentó a 35 °C durante 1 hora. El análisis de NMR mostró una conversión completa. Se añadió agua (690 ml) y los solventes se evaporaron. Se añadió acetato de etilo (8 L) y la mezcla se lavó con ácido clorhídrico 1 M (4 L) y solución de carbonato de sodio al 5 % (4 L). Dado que la extracción con carbonato de sodio formó una emulsión esta capa se extrajo con acetato de etilo (4 L) y se añadió a la porción principal. La capa de acetato de etilo combinada se lavó con salmuera (4 L), se secó en sulfato de sodio anhidro y se filtró. El solvente se evaporó para proporcionar éster metílico de ácido 16-metanosulfoniloxi-hexadecanoico como un sólido blanco. Rendimiento: 1225,4 g (100 %).

^{1}H espectro de NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δH): 4,22 (t, J=6,6 Hz, 2 H); 3,66 (s, 3 H); 3,00 (s, 3 H); 2,30 (t, J=7,5 Hz, 2 H) 1,82-1,67 (m, 2 H); 1,68-1,54 (m, 2 H); 1,36-1,17 (m, 22 H).

El mesilato anterior (1,23 kg, 3,34 mol) se disolvió en acetona (8 L) y se añadió bromuro de litio (585 g, 6,73 mol) y la mezcla de reacción se calentó en un evaporador giratorio Heidolph de 20 L a 50 °C durante 12 horas. Después de enfriar el solvente se evaporó, se añadió acetato de etilo (10 L) y la mezcla se lavó con solución de hidrógeno carbonato de sodio al 5 % (3 x 15 L) y salmuera (8 L). El solvente se evaporó a sequedad para producir éster metílico del ácido 16-bromo-hexadecanoico como un aceite amarillo pálido que comenzó a cristalizar.

Rendimiento: 1219 g (105 %); contiene acetona y producto de aldolización de la acetona.

R_F (SiO_2, hexanos/acetato de etilo 9:1): 0,90.

^{1}H espectro de NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δH): 3,65 (s, 3 H); 3,42 (t, J=6,9 Hz, 2 H); 2,32 (t, J=7,5 Hz, 2 H); 1,92-1,77 (m, 2 H) 1,69-1,53 (m, 2 H); 1,50-1,35 (m, 2 H); 1,25 (bs, 10 H).

Soluciones de sulfito de sodio (327 g, 2,60 mol) en agua (1,26 L) y éster metílico del ácido 16-bromo-hexadecanoico (728 g, 2,00 mol, 96 % de pureza) en 1-propanol (945 ml) y metanol (420 ml) se calentaron a reflujo en un reactor de 6 L equipado con agitador mecánico durante 48 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 27 °C y se diluyó con tetrahidrofurano (2 L). La mezcla de reacción se filtró y el material sólido se lavó con tetrahidrofurano (3 x 700 ml). El filtrado se enfrió a 0 °C y otra porción de material precipitó. Este precipitado se filtró y se lavó con tetrahidrofurano (2 x 200 ml). Los sólidos se combinaron y se mezclaron con agua (8,4 L) en un recipiente de 20 L. Se añadió solución de hidróxido de sodio (120 g, 3,00 mol). La mezcla se calentó a ebullición durante aproximadamente 5 horas. Se añadió lentamente solución de ácido sulfúrico (430 ml, 8,00 mol) en agua (500 ml) a la mezcla de reacción (se forma dióxido de azufre). La mezcla de reacción se calentó a ebullición durante 10 min y después se dejó enfriar a 15 °C (baño de hielo). La mezcla se filtró en embudo de Büchner a través de papel de filtro Seitz (filtro de varias capas) con aplicación de vacío. Este procedimiento fue muy lento y demoró dos días. El material sólido se lavó varias veces con agua destilada hasta que el pH del filtrado estuvo entre 2 y 3. Este procedimiento demoró aproximadamente tres días. El material blanco lodoso se secó en horno a 80 °C para proporcionar el producto deseado.

Rendimiento: 510 g (76 %).

^{1}H espectro de NMR (300 MHz, DMSO-d_6, δH): 2,45-2,33 (m, 2 H); 2,18 (t, J=7,3 Hz, 2 H); 1,60-1,40 (m, 4 H); 1,24 (s, 22 H).

MS-ESI (neg, muestra en H_2O/MeCN + $NaHCO_3$; m/z): 335,5 (M-H)-, 357,5 (M-2H+Na)-, 167,3 $(M-2H)^{2-}$

Síntesis de los compuestos de la invención

Ejemplo 1:

SEQ ID NO:1
hPYY(1-36)
YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH_2

Ejemplo 2:

SEQ ID NO:2
hPYY(3-36)
IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH_2

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 3,37 min (91,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 10,07 min (85,6 %)
MW calculado: 4049,6 g/mol
MALDI MS: 4048,2 g/mol

Ejemplo 3:

SEQ ID NO:3
[L-beta-arginina35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,35 min (79,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,3 min (82,3 %)
MW calculado: 4049,55 g/mol
MALDI (encontrado por MALDSI-MS): 4048,3 g/mol

Ejemplo 4:

SEQ ID NO:4
[L-beta-dihomoarginina35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,53 min (83,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,33 min (88,9 %)
MW calculado: 4077,61 g/mol
MALDI (encontrado por MALDSI-MS): 4076,1 g/mol

Ejemplo 5:

SEQ ID NO:5
[D-beta-homoarginina35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,47 min (82,8 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,31 min (88 %)
MW calculado: 4063,58 g/mol
MALDI (encontrado por MALDSI-MS): 4062,8 g/mol

Ejemplo 6:

SEQ ID NO:6
[beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,47 min (92,9 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,4 min (97,3 %)
MW calculado: 4063,58 g/mol
MALDI (encontrado por MALDSI-MS): 4060,5 g/mol

Ejemplo 7:

SEQ ID NO:7
[Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 10,25 min (84,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,39 min (93,9 %)
MW calculado: 4136,63 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1379,7 ((M/3)+3); 1035,0 ((M/4)+4); 690,4 ((M/6+6)

Ejemplo 8:

SEQ ID NO:8

[Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,70 min (94,1 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,37 min (96,5 %)
MW calculado: 4077,61 g/mol
MALDI (encontrado por MALDSI-MS): 4076,2 g/mol

Ejemplo 9:

SEQ ID NO:9
[Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención UPLC- AP-01: 5,92 min (95,1 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 10,23 min (90,6 %)
MW calculado: 4150,66 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1384,3; ((M/4)+4) 1038,5; ((M/5+5) 831,1

Ejemplo 10:

SEQ ID NO:10
[Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención UPLC- AP-01: 5,38 min (97,3 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 8,29 min (95,7 %)
MW calculado: 4035,53 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1346,0; ((M/4)+4) 1009,3; ((M/5+5) 808,4

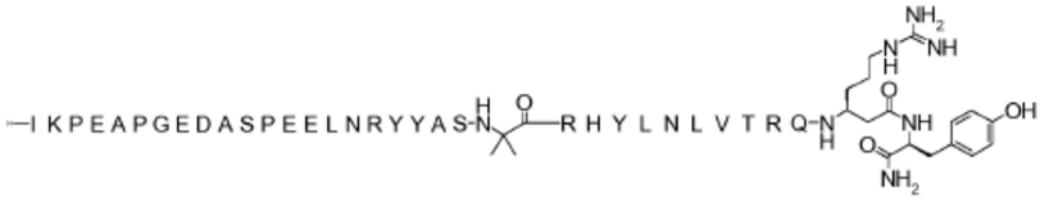
Ejemplo 11:

SEQ ID NO:11
[Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,01 min (94,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,19 min (100 %)
MW calculado: 4049,55 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1350,7 ((M/3)+3); 1013,3 ((M/4)+4)

Ejemplo 12:

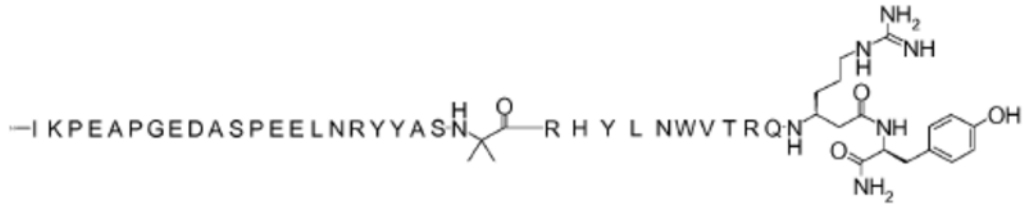
SEQ ID NO:12
[Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 8,6 min (81,3 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,11 min (98,7 %)
MW calculado: 4035,53 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1346 ((M/3)+3); 1009,8 ((M/4)+4); 673,5 ((M/6+6)

Ejemplo 13:

SEQ ID NO:13
[Aib24,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

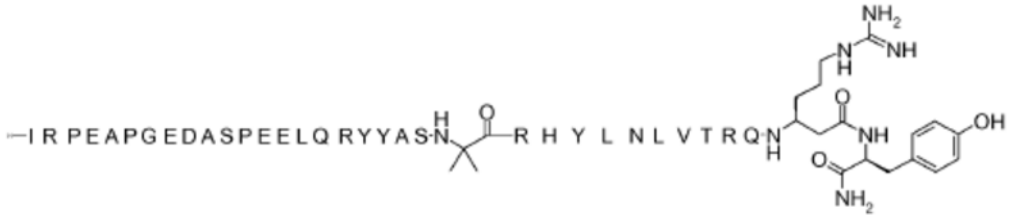


Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 9,05 min (84,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC29v01: 3,19 min (100 %)
MW calculado: 4108,58 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1370,4 ((M/3)+3); 1028,0 ((M/4)+4)

Ejemplo 14:

SEQ ID NO:14

[Arg4,Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36)
Tiempo de retención UPLC- AP-01: 5,61 min (99,3 %)



Tiempo de retención UPLC- AP-02: 10,0 min (97,2 %)
MW calculado: 4077,57 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1360,1; ((M/4)+4) 1020,5; ((M/5+5) 816,3

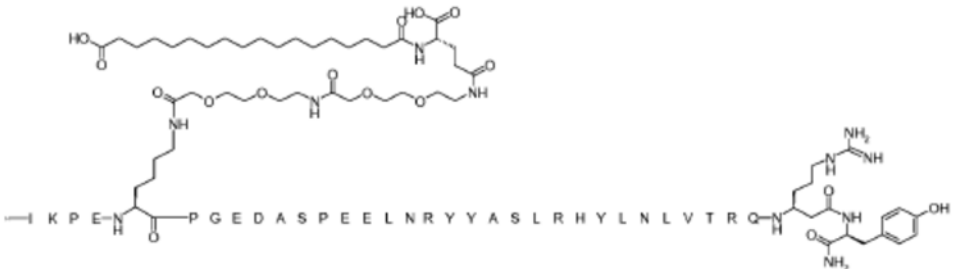
Ejemplo 15:

SEQ ID NO:15
[Arg4,Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36)

Tiempo de retención UPLC- AP-01: 5,4 min (98 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 9,14 min (95,1 %)
MW calculado: 4063,54 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1355,8; ((M/4)+4) 1016,9; ((M/5+5) 814,4

Ejemplo 16:

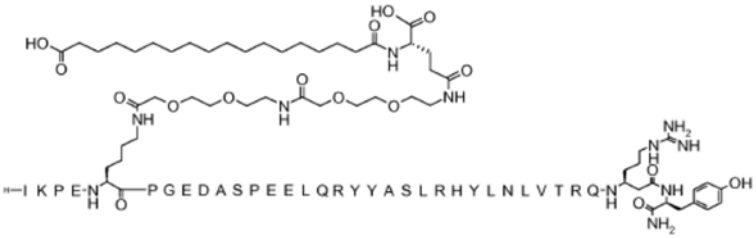
SEQ ID NO:16
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención UPLC- AP-01: 7,34 min (96,7 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 12,37 min (91,4 %)
MW calculado: 4836,57 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1613,0; ((M/4)+4) 1209,3; ((M/5+5) 968,1

Ejemplo 17:

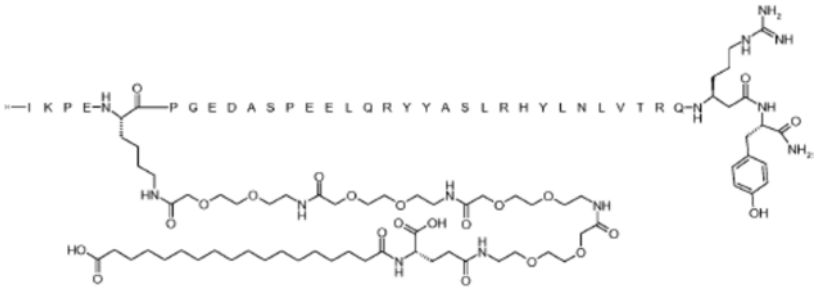
SEQ ID NO:17
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,21 min (97,9 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,72 min (98,2 %)
MW calculado: 4850,59 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1617,9 ((M/3)+3); 1213,7 ((M/4)+4); 809,5 ((M/6+6)

Ejemplo 18:

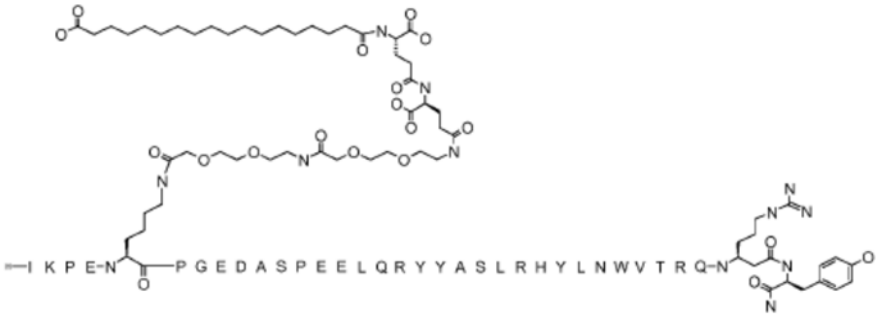
SEQ ID NO:18
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil] -[Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,63 min (96,2 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,788 min (95,9 %)
MW calculado: 5140,91 g/mol
MALDI (encontrado por MALDI-MS): 5139,1 g/mol

Ejemplo 19:

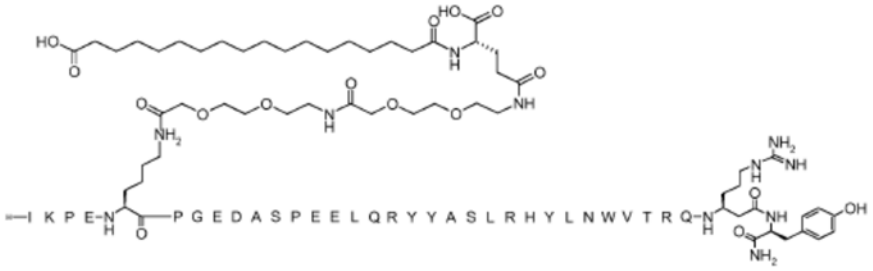
SEQ ID NO:19
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35] hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,45 min (95,1 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC02v01: 7,26 min (100 %)
MW calculado: 5052,76 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 2527,3 ((M/2)+2); 1685,23 ((M/3)+3); 1264,18 ((M/4)+4)

Ejemplo 20:

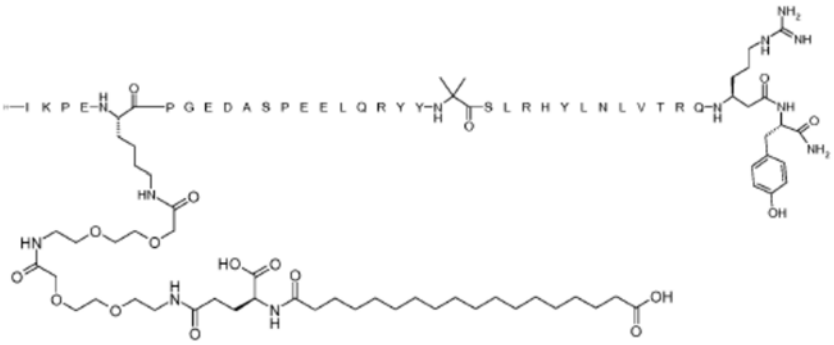
SEQ ID NO:20
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,25 min (96,0 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC02v01: 7,34 min (99,1 %)
MW calculado: 4923,65 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 2462,78 ((M/2)+2); 1642,21 ((M/3)+3); 1231,92 ((M/4)+4)

Ejemplo 21:

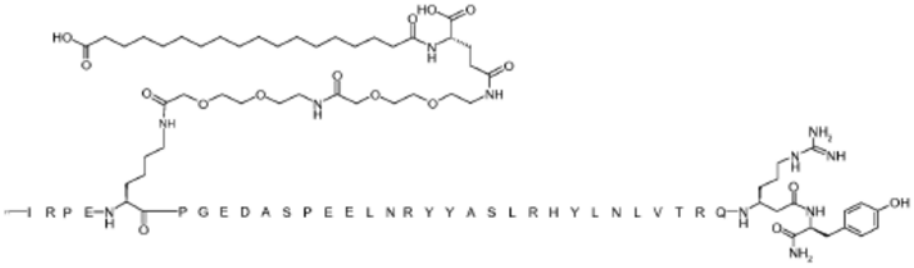
SEQ ID NO:21
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Aib22, beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,37 min (91,5 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,88 min (93 %)
MW calculado: 4864,62 g/mol
MALDI (encontrado por MALDI-MS): 4863,1 g/mol

Ejemplo 22:

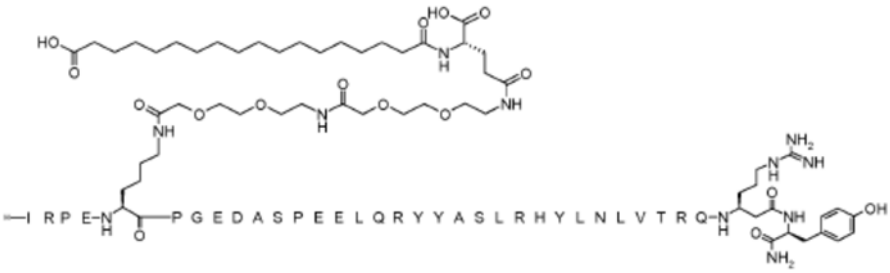
SEQ ID NO:22
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7, beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención UPLC- AP-01: 7,31 min (98,8 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 11,8 min (94,1 %)
MW calculado: 4864,58 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1622,7; ((M/4)+4) 1216,8; ((M/5+5) 973,9

Ejemplo 23:

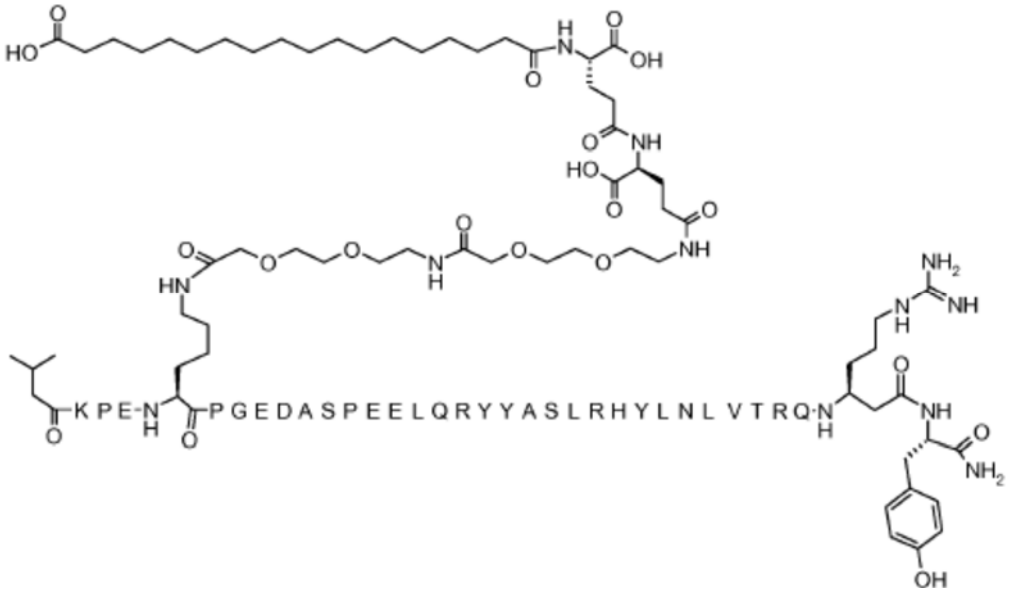
SEQ ID NO:23
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36)



Tiempo de retención UPLC- AP-01: 7,31 min (95,3 %)
Tiempo de retención UPLC- AP-02: 11,9 min
MW calculado: 4878,61 g/mol
LCMS2: ((M/3+3) 1626,4; ((M/4)+4) 1220,2; ((M/5+5) 976,4

Ejemplo 24:

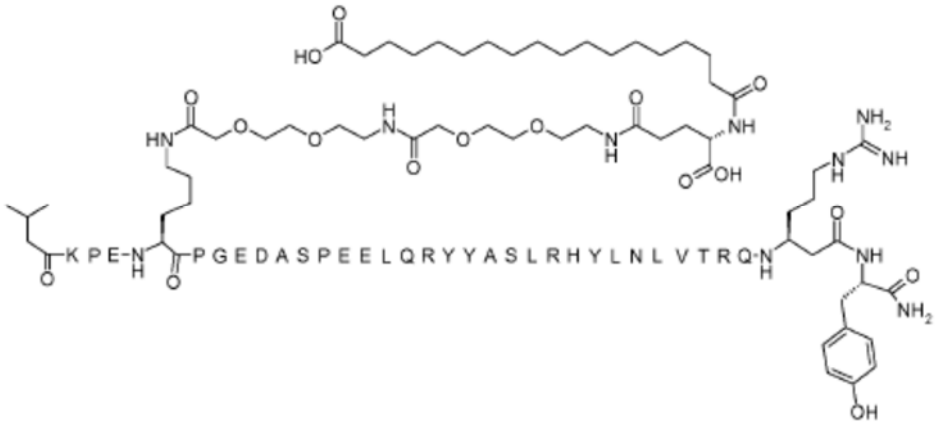
SEQ ID NO:24
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]-amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,03 min (98,9 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC02v01: 7,5 min (100 %)
MW calculado: 4950,67 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z 1653,23 ((M/3)+3); 1238,6 ((M/4)+4)

Ejemplo 25:

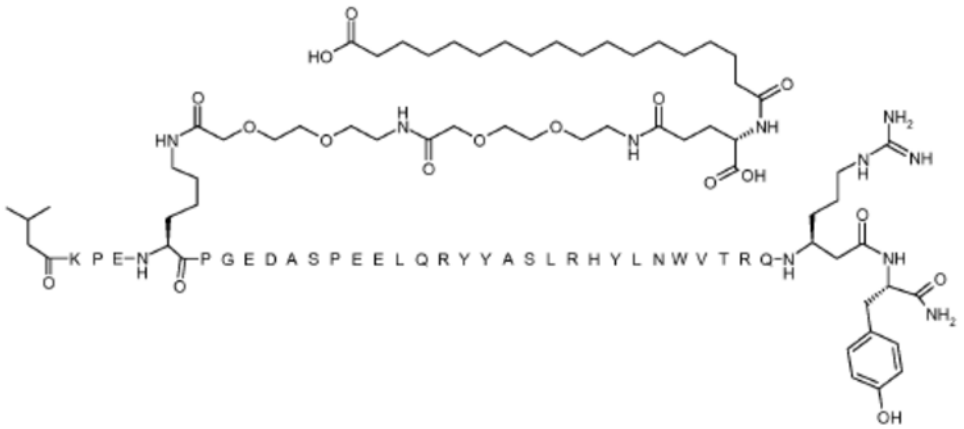
SEQ ID NO:25
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino) butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,18 min (97,7 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC02v01: 7,58 min (99,3 %)
MW calculado: 4821,55 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z 2411,79 ((M/2)+2); 1607,89 ((M/3)+3); 1206,43 ((M/4)+4)

Ejemplo 26:

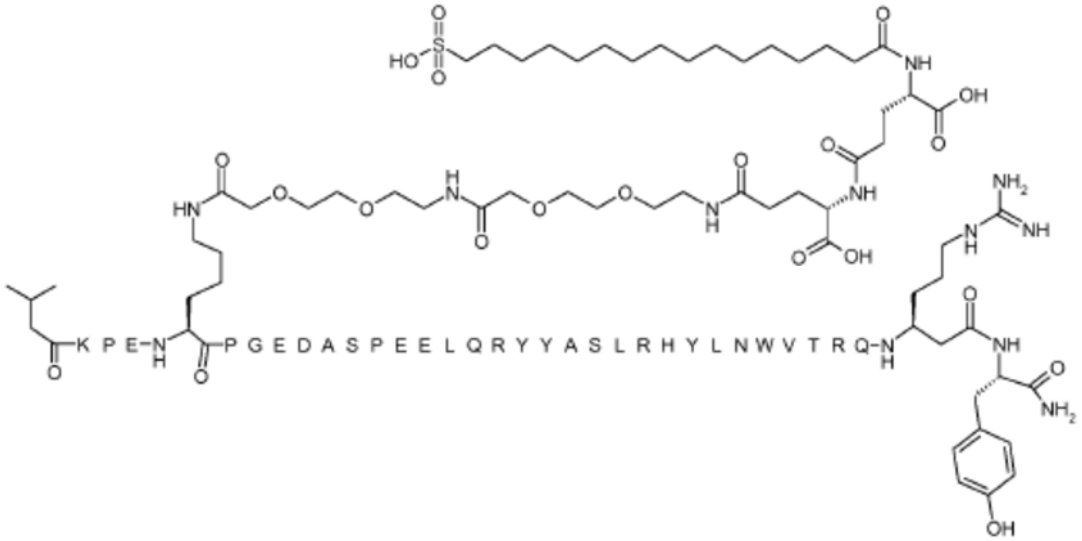
SEQ ID NO:26
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,56 min (98,5 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC31v01: 3,37 min (98,8 %)
MW calculado: 4894,61 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1632,49 ((M/3)+3); 1224,35 ((M/4)+4); 979,67 ((M/5)+5)

Ejemplo 27:

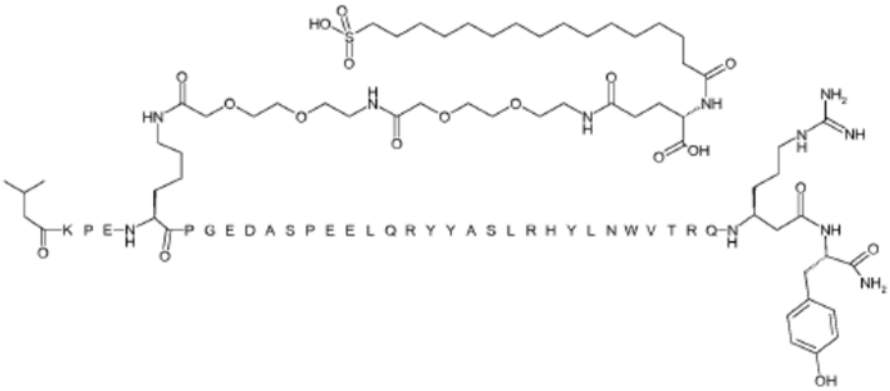
SEQ ID NO:27
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,21 min (83,11 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,44 min (90,5 %)
MW calculado: 5045,75 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1682,85 ((M/3)+3); 1262,37 ((M/4)+4); 1010,09 ((M/5)+5)

Ejemplo 28:

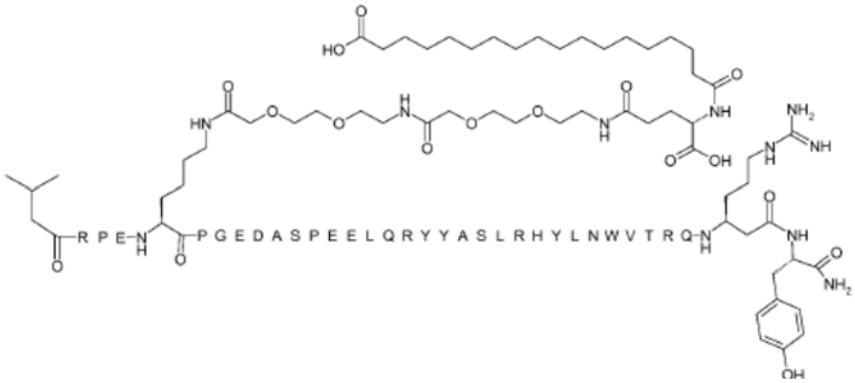
SEQ ID NO:28
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,23 min (88,1 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,35 min (91,7 %)
MW calculado: 4916,63 g/mol
MALDI (encontrado por MALDI-MS): 4914,5 g/mol

Ejemplo 29:

SEQ ID NO:29
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36)



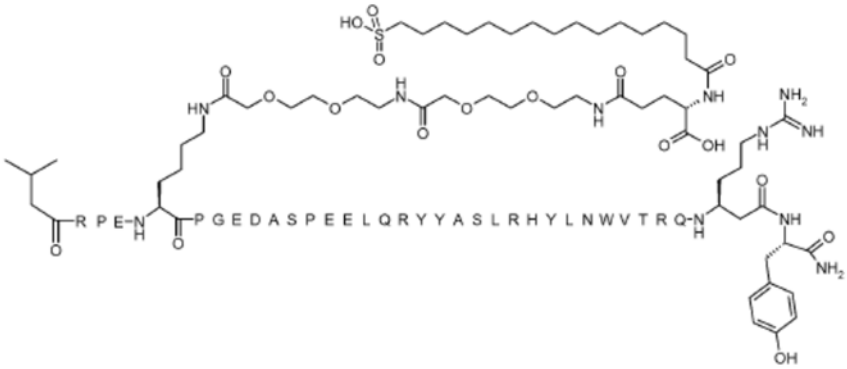
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 12,65 min (94,8 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC32v01: 2,5 min (96,6 %)

MW calculado: 4922,62 g/mol
LCMS (LCMS1): m/z: 1641,48 ((M/3)+3); 985,46 ((M/5)+5)

Ejemplo 30:

SEQ ID NO:30

4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36)



Tiempo de retención del método de HPLC UPLC16v01: 11,36 min (83,4 %)
Tiempo de retención del método de HPLC UPLC30v01: 3,37 min (93,0 %)
MW calculado: 4944,64 g/mol
MALDI (encontrado por MALDI-MS): 4944,3 g/mol

Métodos farmacológicos

La utilidad de los derivados del péptido PYY o sus análogos de la presente invención como agentes farmacéuticamente activos en la reducción de la ganancia de peso y el tratamiento de la obesidad en mamíferos (tales como seres humanos), y para el tratamiento de la diabetes puede demostrarse mediante la actividad de los agonistas en ensayos convencionales y en los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describen a continuación.

Tales ensayos proporcionan además un medio por el cual las actividades de los compuestos de PYY de esta invención pueden compararse con las actividades de compuestos conocidos.

Ejemplo 31: Potencia del receptor de los compuestos de PYY

El propósito de este ejemplo es probar la actividad, o potencia, de los compuestos de PYY in vitro. La potencia in vitro es la medida de la activación de los subtipos de receptor Y1, Y2, Y4 y Y5 humanos, respectivamente, en un ensayo de células completas.

Las potencias de los compuestos de PYY de los ejemplos 2-30 se determinaron con el uso del ensayo de potencia funcional Actone como se describe a continuación. El hPYY(3-36) (Ejemplo 2, SEQ ID NO:2) se incluyó como referencia. Los compuestos de los ejemplos 3-5 se incluyeron como ejemplos comparativos.

Ensayo de potencia funcional Actone

Los receptores del Neuropéptido Y (NPY) son receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína Gi que transducen la señal principalmente a través de la ruta dependiente del AMPc mediante la inhibición de la actividad adenilato ciclasa lo que da como resultado una disminución de la producción de AMPc a partir de ATP. El ensayo Actone se basa en un canal de calcio modificado que tiene una unión selectiva por el AMPc, lo que da como resultado un influjo de calcio celular, detectado por un colorante sensible al calcio. Para medir la disminución de los niveles de AMPc, como resultado de la activación del receptor de NPY, se añade isoproterenol un agonista del receptor β1/β2 adrenérgico para activar la adenilato ciclasa y aumentar los niveles de AMPc en la célula. La disminución de las concentraciones de calcio celular, que reflejan una disminución de los niveles de AMPc debido a la activación del receptor de NPY, se detecta como una disminución en la fluorescencia del colorante sensible al calcio.

Las células HEK-293 que expresan el canal de calcio sensible al AMPc y uno de NPYR-Y1, NPYR-Y2, NPYRY4 o NPYR-Y5 (CodexBiosolution, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) se sembraron en placas de 384 pocillos recubiertos con polilisina a una densidad de 14 000 células/pocillo en un volumen de 25 µl en medio DMEM que contiene suero fetal bovino (FCS) al 10 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, antibiótico aminoglucósido G418 a 250 µg/ml y el antibiótico aminonucleósido puromicina a 1 µg/ml. Las células se incubaron durante toda la noche a +37 °C en un medio humidificado en 5 % de CO_2 seguido de la adición de 25 ml de tampón de colorante de calcio que contiene: 1 frasco de colorante Calcio 5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) disuelto en 100 ml de tampón que contiene Hepes 20 mM, ovoalbúmina al 0,1 %, Tween 20 al 0,005 %, probenecid 1,5 µM, inhibidor de PDE 4-(3-butoxi-4-metoxibencil) imidazolidin-2-ona 250 µM y $CaCl_2$ 8 mM y el pH se ajustó a 7,40. Las células se incubaron durante 1 hora con el tampón de colorante de calcio y después se colocaron en un sistema FLIPR Tetra (Molecular Devices) donde el sistema de manejo del líquido añadió simultáneamente análogo (concentraciones finales de 1000-1 nM) e isoproterenol (concentración final de 0,05 µM) seguido directamente de la medición de la señal de fluorescencia (Ex540/Em590) durante 360 segundos con intervalos de 30 segundos. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y los valores de EC_{50} se calcularon mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a dosis sigmoidales con el uso de GraphPad Prism v 5.02 (Graph Pad software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Los valores de EC50 se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Potencia in vitro

Ejemplo	Compuesto	EC50 de Y2 (nM)	EC50 de Y1 (nM)	EC50 de Y4 (nM)	EC50 de Y5 (nM)
2	hPYY(3-36) SEQ ID NO:2	0,80	6,6	651	8,4
3	SEQ ID NO:3 (ejemplo comparativo)	3,1	> 1000	> 1000	3,1
4	SEQ ID NO:4 (ejemplo comparativo)	798	> 1000	> 1000	798
5	SEQ ID NO:5 (ejemplo comparativo)	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
6	SEQ ID NO:6	5,9	831	> 1000	816
7	SEQ ID NO:7	2,4	> 1000	> 1000	802
8	SEQ ID NO:8	1,4	736	> 1000	951

9	SEQ ID NO:9	3,7	> 1000	> 1000	854
10	SEQ ID NO:10	3,6	> 1000	> 1000	> 1000
11	SEQ ID NO:11	2,5	> 1000	> 1000	> 1000
12	SEQ ID NO:12	3,0	> 1000	> 1000	> 1000
13	SEQ ID NO:13	1,8	> 1000	> 1000	> 1000
14	SEQ ID NO:14	2,5	> 1000	> 1000	> 1000
15	SEQ ID NO:15	3,7	> 1000	> 1000	> 1000
16	SEQ ID NO:16	22	> 1000	> 1000	907
17	SEQ ID NO:17	7,2	964	> 1000	880
18	SEQ ID NO:18	37	> 1000	> 1000	> 1000
19	SEQ ID NO:19	12	> 1000	> 1000	> 1000
20	SEQ ID NO:20	3,9	> 1000	> 1000	> 1000
21	SEQ ID NO:21	9,0	> 1000	> 1000	> 1000
22	SEQ ID NO:22	28	> 1000	> 1000	> 1000
23	SEQ ID NO:23	32	> 1000	> 1000	925
24	SEQ ID NO:24	23	> 1000	> 1000	> 1000
25	SEQ ID NO:25	9,1	> 1000	> 1000	> 1000
26	SEQ ID NO:26	5,7	> 1000	> 1000	> 1000
27	SEQ ID NO:27	25	> 1000	> 1000	> 1000
28	SEQ ID NO:28	5,6	> 1000	> 1000	> 1000
29	SEQ ID NO:29	6,5	> 1000	> 1000	> 1000
30	SEQ ID NO:30	7,4	> 1000	> 1000	

Todos los compuestos de PYY de las invenciones muestran buena potencia de Y2, mientras que la potencia en los receptores Y1, Y4 y Y5 se reduce fuertemente.

Ejemplo 32: Unión a los subtipos de receptor Y1, Y2, Y4 y Y5

El propósito de este ejemplo es probar la unión in vitro de los compuestos de PYY a los subtipos de receptor Y1, Y2, Y4 y Y5, respectivamente. La afinidad de unión al receptor es una medida de la afinidad de un compuesto por los subtipos de receptor Y1, Y2, Y4 y Y5 humanos, respectivamente.

La unión in vitro de los compuestos de PYY de los ejemplos 6-30 se determinó en un ensayo de centelleo por proximidad (SPA) como se describe a continuación. El hPYY(3-36) (Ejemplo 2, SEQ ID NO:2) se incluyó como referencia.

Ensayo de centelleo por proximidad (SPA)

Líneas celulares que expresan el receptor de NPY. Todas las células se cultivaron a +37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2. Las células BHK-482-8 con expresión inducible del receptor NPY-Y1 humano (P25929, NPY1R_HUMAN, Uniprot) se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, penicilina-estreptomicina (P/S) al 1 %, antibiótico G418 a 1 mg/ml, antibiótico higromicina B a 1 mg/ml y aminoácidos no esenciales al 1 %. Se añadió isopropil B-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 1 mM 24 horas antes de cosechar las células para la inducción de la expresión del receptor NPY-Y1. Las células CHO-K1 que expresan de manera estable el receptor NPY-Y2 humano (P49146, NPY2R_HUMAN, Uniprot) se cultivaron en DMEM F-12 con FBS al 10 %, P/S al 1 %, higromicina B a 150 µg/ml y antibiótico puromicina a 10 mg/ml. Las células CHO-K1 que expresan de manera estable el receptor NPY-Y4 humano (P50391, NPY4R_HUMAN, Uniprot) se cultivaron en DMEM F-12 con FBS al 10 %, P/S al 1 %, puromicina a 10 mg/ml. Las células HEK-293 que expresan de manera estable el receptor NPY-Y5 humano (Q15761, NPY5R_HUMAN, Uniprot) se cultivaron en medio DMEM F-12 que contiene FBS al 10 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, G418 a 250 µg/ml y puromicina a 1 µg/ml.

Preparación de las membranas. Las células cultivadas se desprendieron mecánicamente mediante raspado y se lavaron en PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na2HPO4 4,3 mM, KH2PO4 1,47 mM pH ajustado a 7,4) y se transfirieron a tubos y se centrifugaron durante 5 min a 1000 g a +4 °C. Los sedimentos se resuspendieron en tampón de homogeneización frío; Y1: Hepes 20 mM, EDTA 10 mM, con 2 tabletas de cóctel completo de inhibidores de proteasas sin EDTA/50 ml (Roche, Mannheim, Alemania) pH 7,4); Y2, Y4: Hepes 20 mM, MgCl2 5 mM, bacitracina a 1 mg/ml, pH 7,1; Y5: NaCl 10 mM, Hepes 20 mM, KH_2PO_4 0,22 mM, CaCl2 1,26 mM, MgSO4 0,81 mM, pH 7,4 y después se homogeneizaron durante 30 segundos con el uso de un homogeneizador de tejidos a velocidad media. El homogeneizado se centrifugó a 35 000 g con el uso de una ultracentrífuga durante 10 minutos a +4 °C y el sobrenadante se desechó y se añadió tampón de homogeneización fresco. La homogeneización del sedimento se repitió un total de tres veces. El sedimento final se resuspendió en algunos mililitros de tampón de homogeneización y la concentración de proteína se determinó con el uso del método de Bradford y se midió a 595 nm en un lector de

microplacas. La concentración de proteína se ajustó a 1 mg/ml y se transfirió a criotubos y se almacenó a -80 °C. Se añadió sacarosa 250 mM a las membranas con Y5 antes de congelar.

Ensayo. El ensayo SPA de unión al receptor NPY-Y humano se realizó en placas de 96 pocillos blancas en un volumen total de 200 ml por pocillo. Las microesferas recubiertas con aglutinina de germen de trigo que contienen líquido de centelleo (PerkinElmer, Waltham, MA, Estados Unidos) se reconstituyeron en tampón de unión; Y1, Y2: Hepes 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, tween 20 al 0,02 %, ovoalbúmina al 0,25 % pH 7,4; Y4, Y5: Hepes 20 mM, NaCl 10 mM, KH_2PO_4 0,22 mM, $CaCl_2$ 1,26 mM, $MgSO_4$ 0,81 mM, bacitracina al 0,1 % y ovoalbúmina al 0,25 % pH 7,4 y se mezclaron con la preparación de membranas para proporcionar una concentración final de 1 mg de microesferas y 3 mg de membranas con Y1/pocillo, 3 µg de membranas con Y2/pocillo, 1 µg de membranas con Y4/pocillo o 20 µg de membranas con Y5/pocillo. Se añadió 50 000 cpm por pocillo del radioligando [^{125}I]-PYY humano correspondiente a una concentración de 100 pM en los ensayos de unión a Y1, Y2 y Y5. Se usó 50 000 cpm por pocillo del radioligando [^{125}I]-polipéptido pancreático humano correspondiente a una concentración de 100 pM en el ensayo de unión a Y4.

Los análogos liofilizados se disolvieron en 80 % de dimetil sulfóxido (DMSO), 19 % de H_2O y 1 % de ácido acético (CH_3COOH) para soluciones madre de 2 000 µM (Y1, Y4 y Y5) y 200 µM (Y2) y se realizaron diluciones en serie (1:10) en tampón de unión hasta concentraciones finales en el intervalo de 10 000 nM a 1 pM en los ensayos de Y1, Y4 y Y5 y de 1000 nM a 0,1 pM en el ensayo de Y2. Las placas se sellaron y se incubaron a +25 °C durante 2 horas en un agitador de placas configurado a 400 rpm y después de eso se centrifugaron a 1 500 rpm durante 10 minutos antes de la lectura de la luminiscencia en un contador de centelleo y luminiscencia de microplacas. Las placas de SPA de Y1 se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 16 horas antes de la lectura. El desplazamiento del radioligando se midió como la reducción en la luminiscencia y los valores de IC_{50} se calcularon mediante análisis de regresión no lineal de curvas de respuesta a dosis sigmoidales. Los valores de Ki para la afinidad de unión se adquirieron mediante la ecuación de Cheng-Prusoff (Ki=IC50/(1+[L]/Kd) que incluye los valores de Kd específicos del receptor (Y1=0,556; Y2=0,275; Y4=0,111; Y5=0,345), la concentración de radioligando y los valores de IC50.

Todos los compuestos de PYY de la invención muestran una buena unión a Y2 mientras que la afinidad de unión en los receptores Y1, Y4 y Y5 se reduce fuertemente.

Tabla 2: Afinidad de unión a receptor Y

Ejemplo	Compuesto	Ki de Y2 (nM)	Ki de Y1 (nM)	Ki de Y4 (nM)	Ki de Y5 (nM)
2	hPYY(3-36) SEQ ID NO:2	0,25	46	83	4,5
6	SEQ ID NO:6	1,7	3683,30	5444	
7	SEQ ID NO:7	1,6	6884,67	3555	658
8	SEQ ID NO:8	2,8	>10 000	5743	778
9	SEQ ID NO:9	0,60	>10 000	1449	576
16	SEQ ID NO:16	3,6	8819,50	>10 000	974
17	SEQ ID NO:17	2,7	5373,00	5559	3801
18	SEQ ID NO:18	13	>10 000	>10 000	1875
19	SEQ ID NO:19	7,5	>10 000	>10 000	1405
20	SEQ ID NO:20	3,1	>10 000	>10 000	2636
21	SEQ ID NO:21	5,8	>10 000	>10 000	1727
22	SEQ ID NO:22	5,1	>10 000	>10 000	434
23	SEQ ID NO:23	9,5	>10 000	>10 000	972
24	SEQ ID NO:24	27	>10 000	>10 000	4839
25	SEQ ID NO:25	7,1	>10 000	>10 000	4930
26	SEQ ID NO:26	5,5	>10 000	>10 000	2757
27	SEQ ID NO:27	31	>10 000	>10 000	5915
28	SEQ ID NO:28	7,8	>10 000	>10 000	2487
29	SEQ ID NO:29	9,1	>10 000	9.636	1828
30	SEQ ID NO:30	15	>10 000	>10 000	2684

Ejemplo 33: Estudio farmacocinético en minicerdos

El propósito de este estudio es determinar la vida media in vivo de los compuestos de PYY después de la administración i.v. a minicerdos, es decir, la prolongación de su tiempo en el cuerpo y de este modo de su tiempo de acción. Esto se hizo en un estudio farmacocinético (PK), donde se determinó la vida media terminal del derivado en cuestión. Por vida media terminal generalmente se entiende el período de tiempo que se tarda en reducir a la mitad una determinada concentración plasmática, medida después de la fase de distribución inicial.

Estudios in vivo de evaluación farmacocinética en minicerdos Göttingen después de la administración intravenosa. Animales. Minicerdos Göttingen hembras, 15-25 kg, adquiridos de Ellegaard Minipigs, Dinamarca. Los animales se albergaron en la Unidad Animal, Novo Nordisk A/S y se mantuvieron y manejaron de acuerdo con el procedimiento normal en la Unidad Animal. Después de un mínimo de 2 semanas de aclimatación se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis en cada animal. Después de la cirugía los animales estuvieron en sus corrales individuales normales durante los experimentos farmacocinéticos.

Peso Corporal Los animales se pesaron semanalmente. Los animales se dejaron en ayunas por la mañana antes de la dosificación pero tenían acceso ad libitum al agua; la comida se suministró durante la dosificación.

Administración de péptidos y soluciones de dosificación. Las inyecciones intravenosas se proporcionaron a través del catéter corto central, que se purgó con 10 ml como mínimo de solución salina estéril después de la administración. La sustancia de prueba se dosificó a 15 nmol/kg, n = 3, en un volumen de 0,05 ml/kg. Tampón: fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 70 mM, tween 80 al 0,05 %, pH 7,4 o HEPES 20 mM, glicerol al 2,2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, pH 6,5.

Muestras de sangre y análisis. Las muestras de sangre se extrajeron a través del catéter central de acuerdo con el siguiente esquema: Predosis, 5, 15, 30, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 168 h, 192 h, 216 h, 240 h, 264 h y 288 h. En el día 1 los catéteres se acoplan a tubos de extensión, que se retirarán al final del día 1. Las muestras (0,8 ml) se extrajeron a través del catéter. La sangre se recolectó en tubos de ensayo que contenían tampón EDTA (8 mM) y 50 µl de tampón Val-Pyr (tampón de estabilización que contiene 3,097 g de K3EDTA disueltos en 50 ml de Trasylol y se añadió 0,5 ml de Val-Pyr 20 mM. El pH se reguló a 7,4). Después de cada muestra de sangre el catéter se purgó con 5 ml como mínimo de NaCl estéril al 0,9 % y heparina a 10 IE/ml. Se requirió una técnica aséptica para evitar el crecimiento bacteriano en el catéter que aumenta el riesgo de formación de coágulos en el catéter. Las muestras se mantuvieron en hielo húmedo hasta la centrifugación (10 min, 4 °C, 1942 g). Después de eso, el plasma (mín. 200 µl) se transfirió inmediatamente a tubos Micronic y se mantuvo a -20 °C hasta el análisis. Las muestras de plasma se analizaron por LC/MS como se describe a continuación.

Datos y resultados. Los perfiles de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental con el uso de Phoenix (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos). Los cálculos se realizaron con el uso de valores de concentración y tiempo individuales de cada animal.

Análisis de las muestras

Ensayo cuantitativo para muestras de plasma. Las sustancias de prueba se ensayaron en plasma mediante cromatografía de flujo turbulento acoplada a cromatografía líquida con detección posterior por espectrometría de masas (TFC/LC/MS). La selectividad del método permitió cuantificar varios compuestos en una muestra, por ejemplo, la dosificación del casete de cuatro compuestos por animal. Las concentraciones de la sustancia de prueba en muestras desconocidas se calcularon con el uso del área del pico en función de la cantidad. Se construyeron gráficos de calibración basados en muestras de plasma enriquecidas con el analito mediante análisis de regresión. El intervalo dinámico típico para el ensayo fue 1 - 2000 nmol/l. El rendimiento del método se garantizó mediante el ensayo conjunto de muestras de control de la calidad (QC) por duplicado a tres niveles de concentración. Las soluciones madre y de trabajo de los analitos se prepararon en plasma y se incubaron a 37 °C durante 1 hora.

Preparación de las muestras. Se añadió 40,0 µl de EDTA-plasma 160 µl de metanol al 50 %, ácido fórmico al 1 %, después se agitó en vórtex y se centrifugó a 14 300 rpm (16 457 g) a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos, (las placas se preincubaron con BSA al 0,4 %, 37 °C durante ½ hora). El volumen de inyección fue 25 µl.

Para la limpieza de la muestra se usó una columna TurboFlow Cyclone (0,5 x 50 mm) de Thermo Scientific, Franklin, MA, Estados Unidos, y la separación por LC se realizó en una columna Onyx C18 (2,0 x 50 mm) de Fenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos. Los eluyentes eran combinaciones isocráticas y de gradientes de metanol, acetonitrilo, agua Milli-Q y ácido fórmico. La detección selectiva se realizó por espectrometría de masas con funcionamiento en modo de ionización positivo.

Manejo de los datos. Los perfiles de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental con el uso de Phoenix (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos). Los cálculos se realizaron con el uso de valores de concentración y tiempo individuales de cada animal.

Tabla 3: Vida media (t½)

Ejemplo	Compuesto	t½ (horas)
2	hPYY(3-36) SEQ ID NO:2	0,3
7	SEQ ID NO:7	0,2
8	SEQ ID NO:8	2,2

11	SEQ ID NO:11	0,7
16	SEQ ID NO:16	77
17	SEQ ID NO:17	93
18	SEQ ID NO:18	58
19	SEQ ID NO:19	62
20	SEQ ID NO:20	70
22	SEQ ID NO:22	56
25	SEQ ID NO:25	85
28	SEQ ID NO:28	61
30	SEQ ID NO:30	66

Los derivados de PYY probados de la invención tienen vidas medias muy largas en comparación con la vida media de hPYY(3-36) y los análogos de hPYY(3-36) no derivatizados.

Ejemplo 34: Estudios farmacodinámicos en ratones db/db

Para determinar los efectos in vivo de los compuestos de PYY sobre la glucosa en sangre y la ingesta de alimentos en ratones db/db, los compuestos se dosificaron a ratones db/db y los efectos sobre la glucosa en sangre y la ingesta de alimentos se midieron como se describe a continuación.

Los ratones db/db machos se albergan en un ritmo diario normal (ciclo de oscuridad de 6 pm a 6 am) y se les proporciona acceso ad libitum a la dieta de Altromin. A las 11-13 semanas de edad los ratones se hacen corresponder en cuanto a la glucosa en sangre así como también el peso corporal y se dividen en grupos correspondientes de 9 ratones y se albergan 3 por jaula. Los ratones se dosifican por vía subcutánea con el compuesto indicado o vehículo (Na2HPO4 50 mM, pH 7,4, NaCl 70 mM, Tween 80 al 0,05 %) en un volumen de 2,5 ml/kg a las dosis indicadas a las 4 pm (tiempo =0) y en algunos experimentos se proporcionó una segunda inyección en el tiempo=23 horas. La glucosa en sangre y la ingesta de alimentos se miden en los puntos de tiempo indicados después de la inyección, por ejemplo, a las 4 h, 16 h, 23 h y 40 h después de la inyección. Las muestras de sangre para la glucosa en sangre se extraen de la vena de la cola, en un tubo capilar recubierto con 5 µl de heparina que se coloca en un tubo eppendorf con solución del sistema Biosen® (250 µl). Las muestras se analizan inmediatamente en un instrumento Biosen®.

Las mediciones de glucosa en sangre (BG) se informan como media ± SEM del % de BG ajustado con vehículo con relación a antes del tratamiento y se calcula de la siguiente manera:

100-[%BG(vehículo,promedio)-%BG]

donde,

%BG=100*[BG(tiempo=t)/BG(antes del tratamiento)]

y %BG(vehículo,promedio)=promedio de valores de %BG para el grupo con vehículo en el tiempo=t con relación al vehículo antes del tratamiento.

La ingesta de alimentos se informa como media ± SEM de la ingesta de alimentos por jaula como un porcentaje de ingesta de alimentos promedio del grupo con vehículo para el intervalo indicado.

Tabla 4: Efecto sobre la glucosa en sangre en ratones db/db

Ejemplo	Compuesto	Dosis (µmol/kg)	% de cambio en la glucosa en sangre			
			4 h	16 h	23 h	40 h
16	SEQ ID NO:16	1	59	73	76	78
17	SEQ ID NO:17	0,3	79	94	93	96
22	SEQ ID NO:22	1	69	76	79	80
30	SEQ ID NO:30	1	-	71	63	-
28	SEQ ID NO: 28	1	-	60	53	-
29	SEQ ID NO: 29	1	-	70	61	-
20	SEQ ID NO: 20	1	-	72	57	-
25	SEQ ID NO: 25	1	-	75	76	-

Tabla 5: Efecto sobre la ingesta de alimentos en ratones db/db

Ejemplo	Compuesto	Dosis (µmol/kg)	% de cambio en la glucosa en sangre			
			4 h	16 h	23 h	40 h
16	SEQ ID NO:16	1	31	25	28	38
17	SEQ ID NO:17	0,3	30	55	57	62
22	SEQ ID NO:22	1	54	31	36	45
30	SEQ ID NO:30	1	-	29	27	-
28	SEQ ID NO: 28	1	-	20	26	-
29	SEQ ID NO: 29	1	-	19	22	-
20	SEQ ID NO: 20	1	-	55	105	-
25	SEQ ID NO: 25	1	-	37	41	-

Estos datos respaldan fuertemente el efecto de reducción de la glucosa en sangre y la inhibición de la ingesta de alimentos de los compuestos de PYY de la invención.

Aunque determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para un experto en la técnica.

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> Compuestos de PYY selectivos y sus usos

<130> 130010W001

<160> 30

<170> Novo Nordisk A/S PatSeq 1.0.3.3

<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 1

```
Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
                20                  25                  30
Arg Gln Arg Tyr
            35
```

<210> 2
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 2

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Arg Tyr
        35
```

<210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-arginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 3

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Arg Tyr
        35
```

<210> 4
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-dihomoarginina

<220>

<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)

<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 4

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 5
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= D-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 5

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 6
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)

<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 6

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 7
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 7

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 8
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res

<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 8

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 9
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 9

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 10
<211> 36

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 10

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Ala Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 11
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (24)..(24)
<223> /mod_res= "ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 11

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 12
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res

<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (24)..(24)
<223> /mod_res= "ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 12
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu

1 5 10 15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
20 25 30
Arg Gln Xaa Tyr

<210> 13
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (24)..(24)
<223> /mod_res= "ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 13
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1 5 10 15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Xaa Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
20 25 30
Arg Gln Xaa Tyr
35

<210> 14
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (24)..(24)
<223> /mod_res= "ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 14

```
Xaa Xaa Ile Arg Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Xaa Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 15
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 15

```
Xaa Xaa Ile Arg Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Ala Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 16
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 16

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 17
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)

<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 17

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
```

<210> 18
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 18

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 19
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>

<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 19

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 20
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 20

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 21
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente: [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (22)..(22)
<223> /mod_res= "ácido 2-aminoisobutírico (Aib)"

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 21

```
Xaa Xaa Ile Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Xaa Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 22
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res

<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 22

```
Xaa Xaa Ile Arg Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 23
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(2)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)

<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 23

```
Xaa Xaa Ile Arg Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 24
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 24

```
Xaa Xaa Xaa Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 25
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 25
Xaa Xaa Xaa Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1 5 10 15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
20 25 30
Arg Gln Xaa Tyr
35

<210> 26
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>

<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 26

```
Xaa Xaa Xaa Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 27
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:

3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 27

```
Xaa Xaa Xaa Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

<210> 28
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res

<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 28

```
Xaa Xaa Xaa Lys Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 29
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Arg tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)

<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 29

```
Xaa Xaa Xaa Arg Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
            20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
        35
```

<210> 30
<211> 36
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Proteína artificial basada en el PYY humano

<220>
<221> Mod_Res
<222> (1)..(3)
<223> /mod_res= Estas posiciones están eliminadas

<220>
<221> Mod_Res
<222> (4)..(4)
<223> /mod_res= El grupo alfa amino de la Arg tiene el siguiente sustituyente:
3-Metilbutanoilo

<220>
<221> Mod_Res
<222> (7)..(7)
<223> /mod_res= El grupo épsilon amino de la Lys tiene el siguiente sustituyente:
[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]
etoxi]etoxi]acetil]-

<220>
<221> Mod_Res
<222> (35)..(35)
<223> /mod_res= L-beta-homoarginina

<220>
<221> Mod_Res
<222> (36)..(36)
<223> /mod_res= "Amidación"

<400> 30

```
Xaa Xaa Xaa Arg Pro Glu Lys Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
  1               5                  10                  15
Leu Gln Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Trp Val Thr
             20                  25                  30
Arg Gln Xaa Tyr
         35
```

REIVINDICACIONES

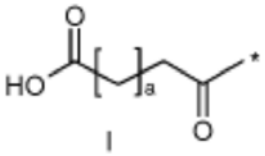
1. Un compuesto de PYY que comprende L-beta-homoarginina en una posición correspondiente a la posición 35 de hPYY(1-36) (SEQ ID NO:1), y una sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. Un compuesto de PYY de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de PYY tiene un máximo de 10 modificaciones de aminoácidos en comparación con hPYY(3-36).

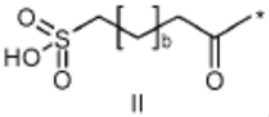
3. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además triptófano en una posición correspondiente a la posición 30 de hPYY(1-36).

4. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las posiciones correspondientes a las posiciones 1-3 de hPYY(1-36) están ausentes, y en donde el compuesto de PYY comprende además un sustituyente N-terminal, en donde el sustituyente N-terminal es 3-metilbutanoilo.

5. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una lisina en una posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36) y un grupo modificador unido al grupo épsilon amino del residuo de lisina en la posición 7, en donde dicho grupo modificador se define por A-B-C-,
en donde A- se selecciona de

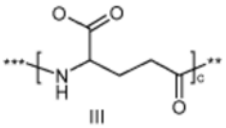

I

o

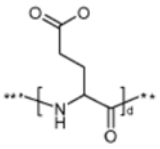

II

,

en donde a es un número entero de 12 a 19, y b es un número entero de 10 a 16, y en donde * denota el punto de unión a -B-,
en donde B- se selecciona de

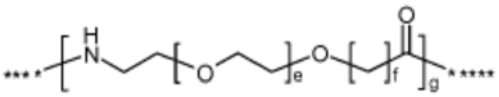

III

o


IV

,

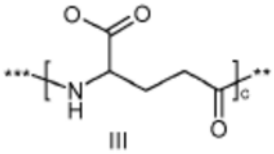
en donde c es 1 o 2; y d es 1 o 2; y en donde *** denota el punto de unión a A-, y ** denota el punto de unión a -C-, y
en donde -C- es


V

,

en donde e es un número entero en el intervalo de 1-5, f es un número entero en el intervalo de 1-5, g es un número entero en el intervalo de 2 a 6, y en donde **** denota el punto de unión a -B-, y ***** denota el punto de unión al grupo épsilon amino del residuo de lisina en la posición correspondiente a la posición 7 de hPYY(1-36).

6. Un compuesto de PYY de acuerdo con la reivindicación 5, en donde B- es


III

,

en donde c es 1 o 2; y en donde *** denota el punto de unión a A-, y ** denota el punto de unión a -C-.

7. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde e y f son cada uno 1.

8. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde g se selecciona de 2, 4 o 6.

9. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de los siguientes:

[beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:6)

[Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:7)

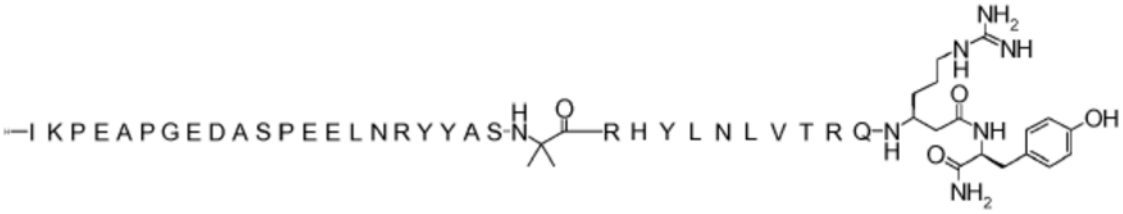
[Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:8)

[Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:9)

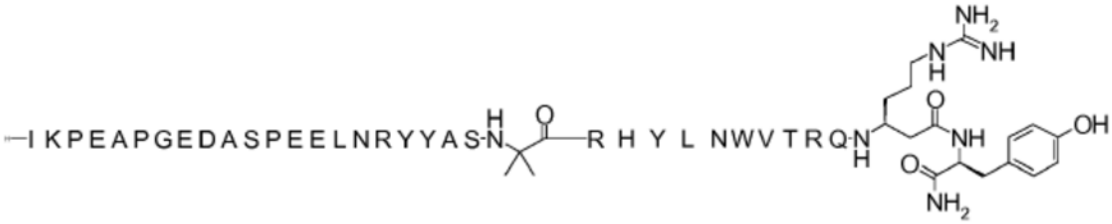
[Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:10)

[Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:11)

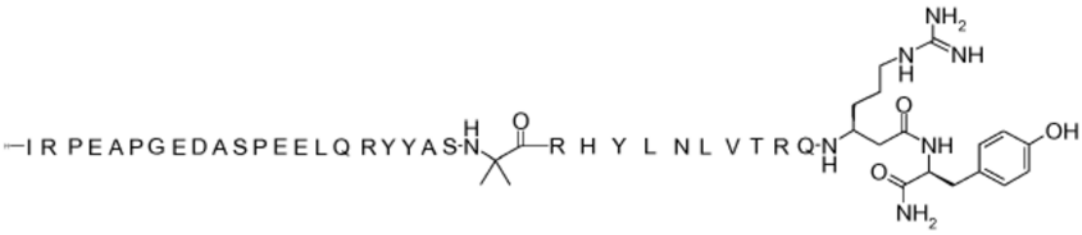
[Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:12)



[Aib24,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:13)

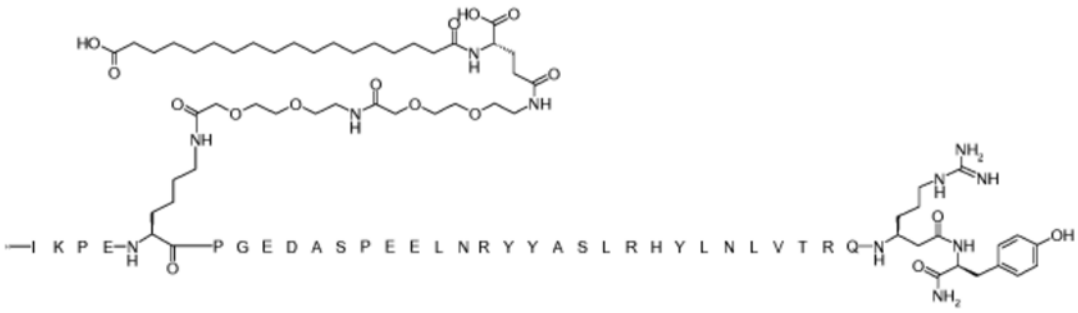


[Arg4,Gln18,Aib24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:14)

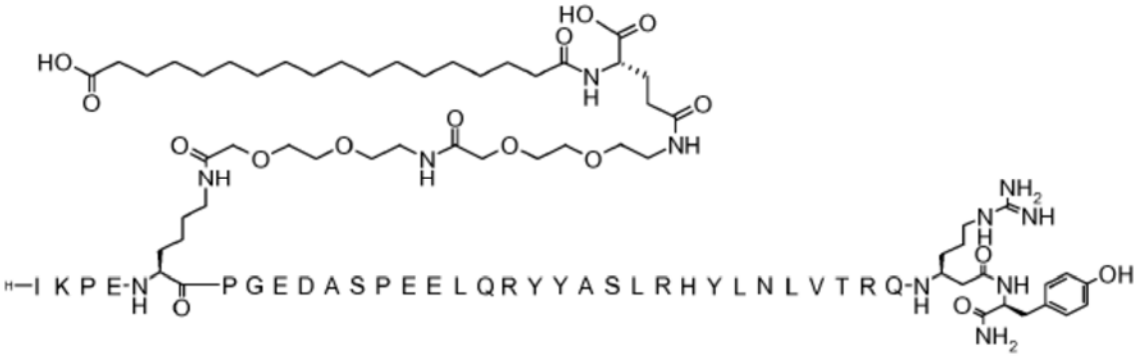


[Arg4,Gln18,Ala24,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:15)

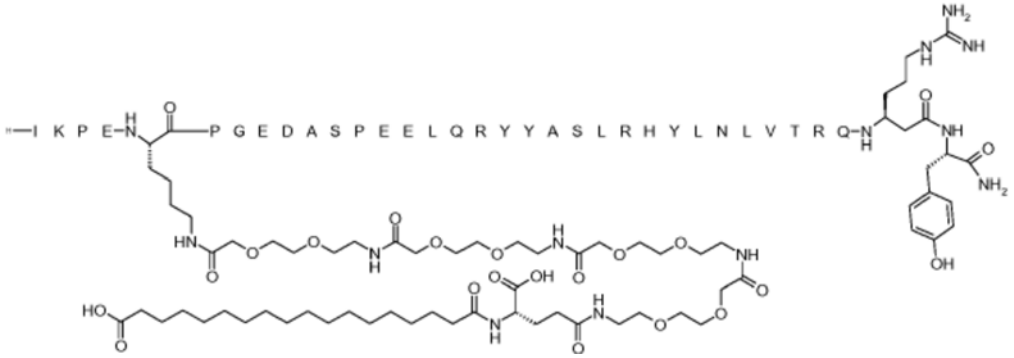
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoil-amino)butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:16)



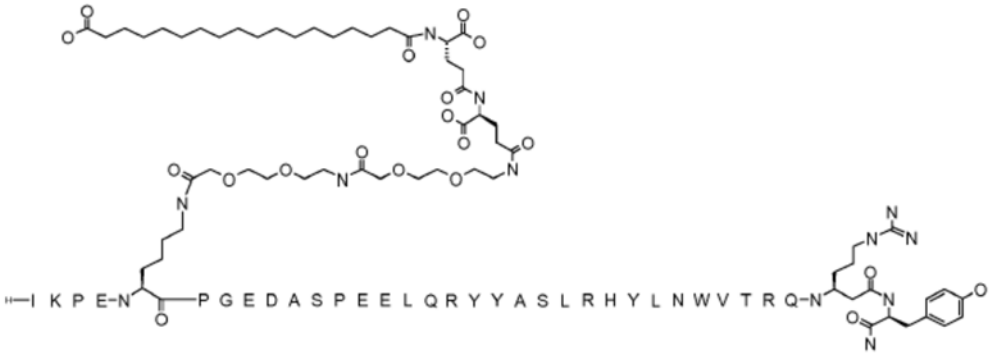
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:17)



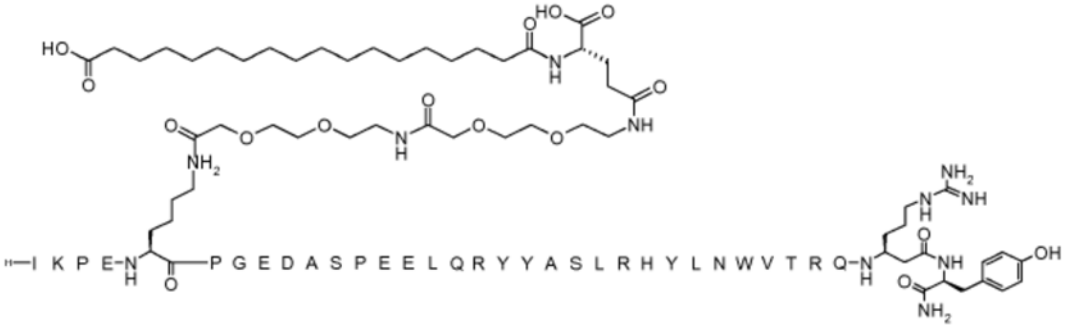
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil] -[Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:18)



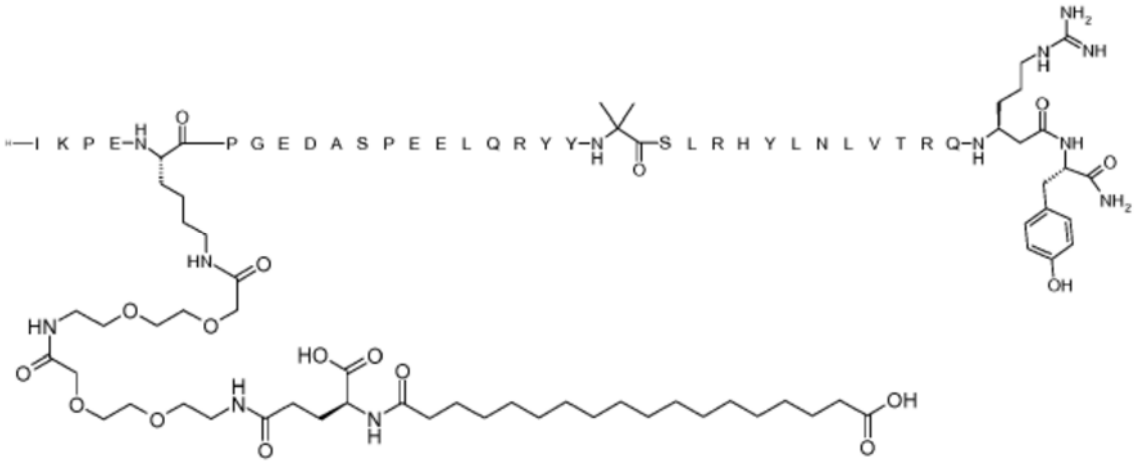
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35] hPYY(3-36) (SEQ ID NO:19)



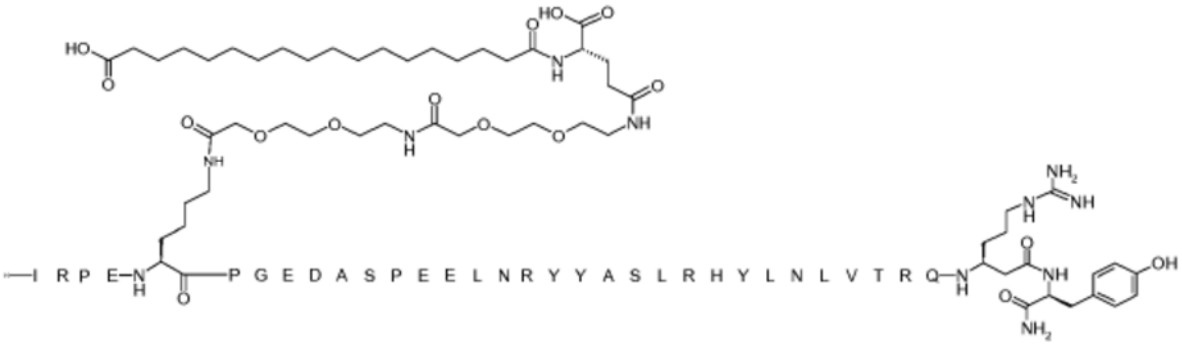
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:20)



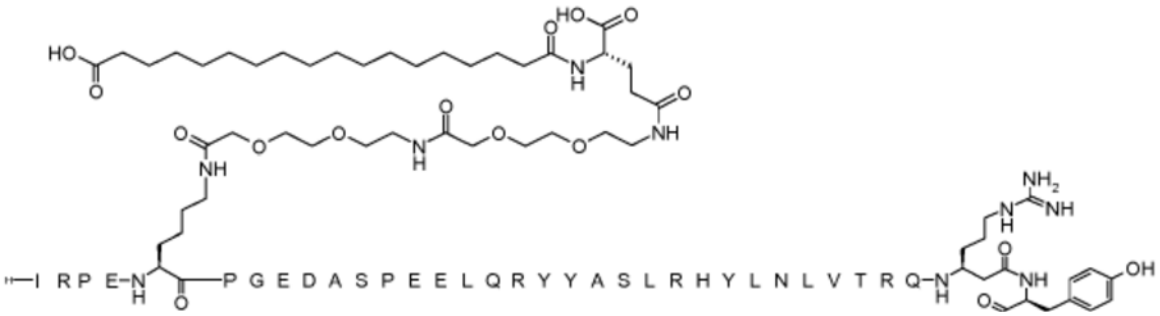
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Aib22, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:21)



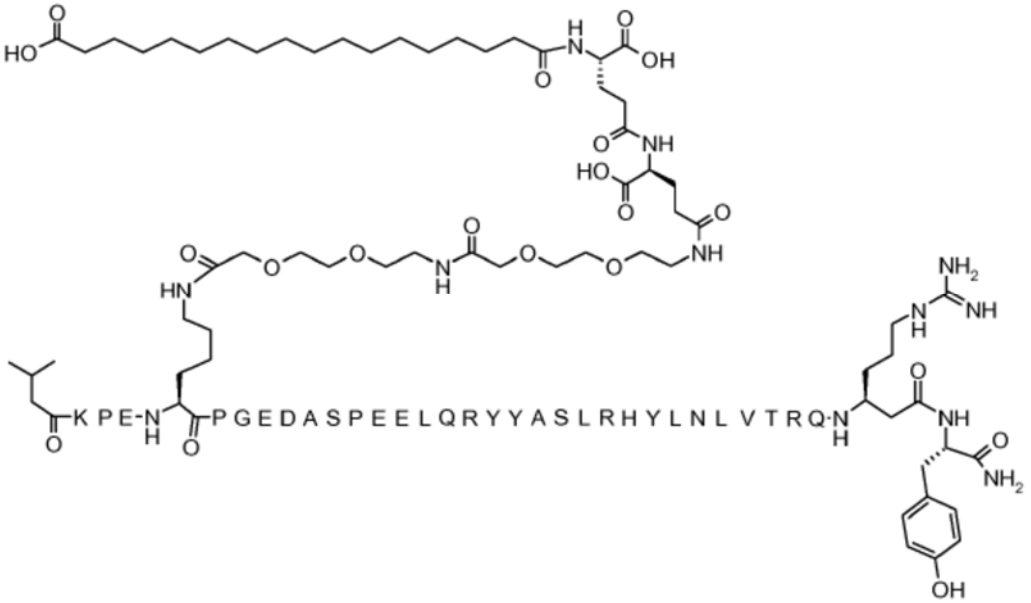
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:22)



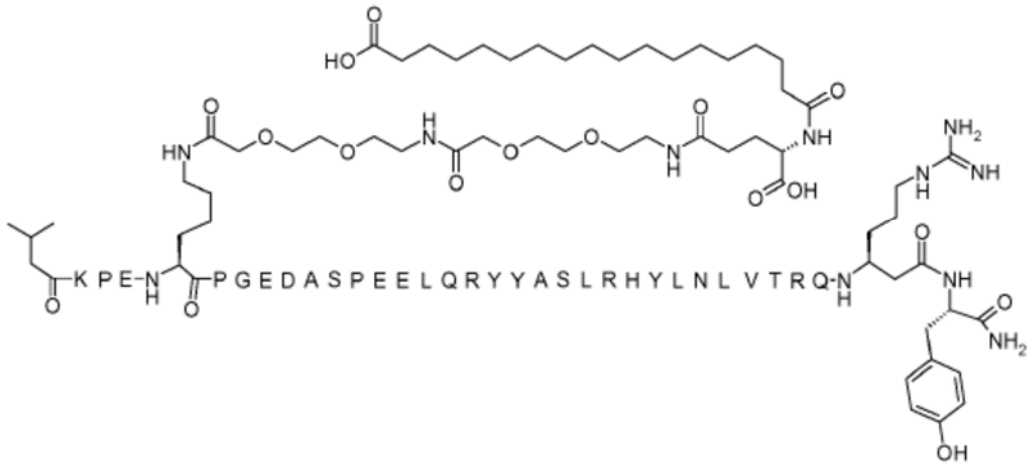
7-N{Épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18, beta-homoArg35]hPYY(3-36) (SEQ ID NO:23)



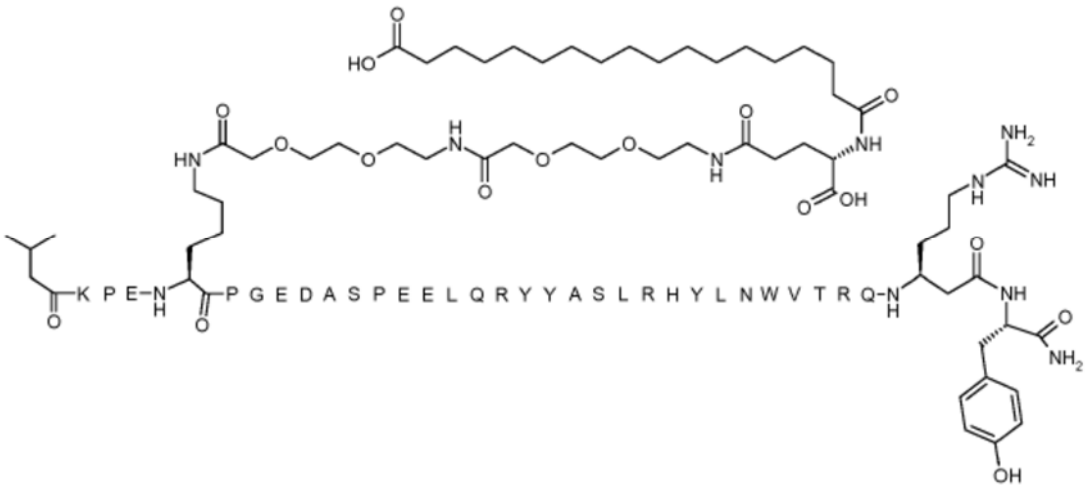
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]-amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:24)



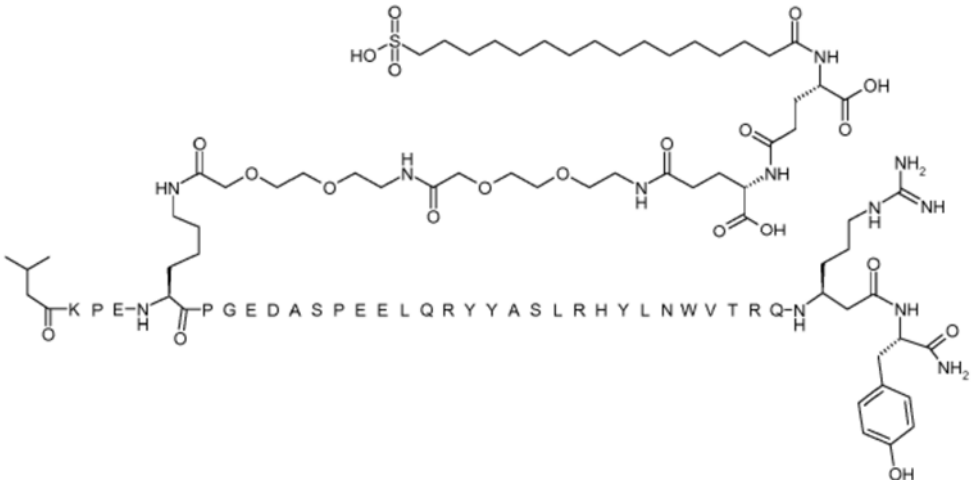
4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino) butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[,Lys7,Gln18,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:25)



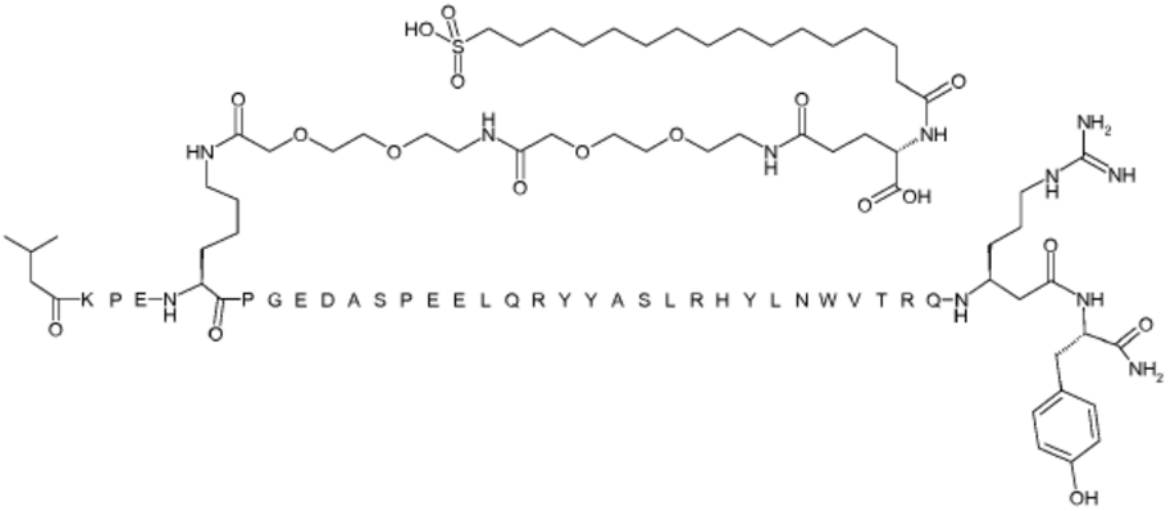
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:26)



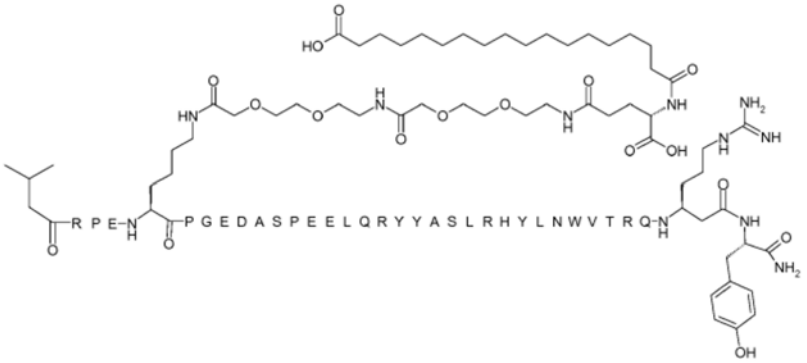
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]butanoil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30, beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:27)



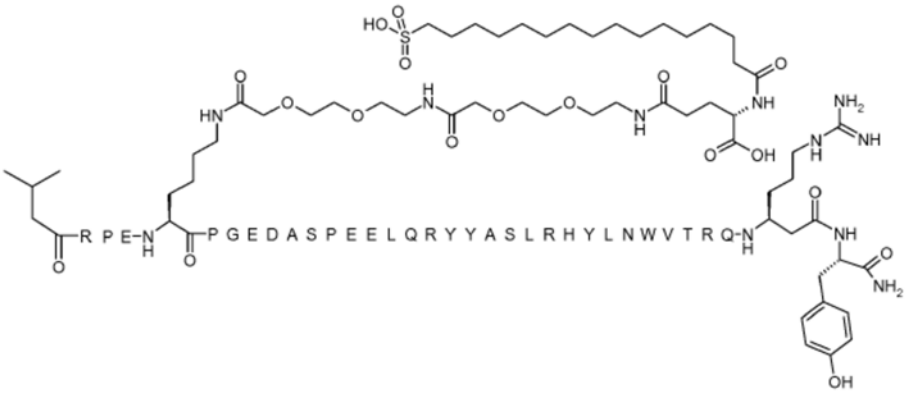
4-N{alfa}(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]-[Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:28)



4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,beta-homoArg35]hPYY(4-36) (SEQ ID NO:29)



4-N{alfa}-(3-Metilbutanoil)-7-N{épsilon}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-sulfohexadecanoilamino)-butanoil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acetil]-[Arg4,Lys7,Gln18,Trp30,betahomoArg35] hPYY(4-36) (SEQ ID NO:30)



10. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para el uso como un medicamento.

11. Un compuesto de PYY de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para el uso en el tratamiento y/o prevención de todas las formas de diabetes y enfermedades relacionadas, tales como trastornos alimentarios, complicaciones diabéticas, enfermedades cardiovasculares y/o apnea del sueño; y/o para mejorar los parámetros lipídicos, mejorar la función de las células-β, y/o para retardar o prevenir la progresión de la enfermedad diabética.