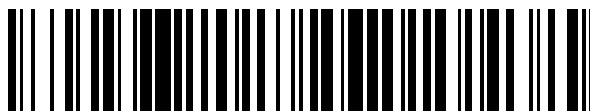


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 139**

51 Int. Cl.:

C07K 17/08 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008 E 08865748 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2233504**

54 Título: **Un derivado peptidomimético de eritropoyetina y su sal farmacéutica, la preparación y usos del mismo**

30 Prioridad:

12.12.2007 CN 200710198751

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

16.07.2015

73 Titular/es:

**JIANGSU HANSOH PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(100.0%)
THE 10TH INDUSTRIAL SUB-ZONE OF
DEVELOPMENT ZONE
LIANYUNGANG, JIANGSU 222047, CN**

72 Inventor/es:

**LÜ, AIFENG;
SUN, CHANGAN;
JIANG, TAO;
WU, WENTAO y
WANG, YALI**

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 541 139 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

Un derivado peptidomimético de eritropoyetina y su sal farmacéutica, la preparación y usos del mismo.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un derivado peptidomimético de eritropoyetina (EPO) y sus sales farmacéuticas que se unen al receptor de EPO y activan el receptor de EPO o tienen el efecto agonista de EPO. Específicamente, la presente invención se refiere a un derivado peptidomimético de EPO, derivados para uso en un método de tratamiento de trastornos caracterizados por bajo nivel de EPO o población insuficiente o defectuosa de glóbulos rojos, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La EPO es una hormona glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 34 kD. La EPO en el plasma está compuesta por 165 aminoácidos con alto grado de glucosilación, en los que el componente principal de glucosilo es ácido siálico. En base al contenido de carbohidratos, la EPO de origen natural se divide en dos tipos, concretamente tipo α y β , en los que el tipo α contiene el 34% de carbohidrato y el tipo β contiene el 26% de carbohidrato. Estos dos tipos tienen las mismas características biológicas, antigenicidad y efecto clínico. El gen de EPO humana está ubicado en el área 22 del brazo largo del cromosoma 7. Su ADNc se clonó con éxito en 1985, y EPO humana recombinante (rHuEPO) se ha estado produciendo en gran medida usando tecnología recombinante génica y se ha usado ampliamente en clínica. La EPO se ha biosintetizado usando tecnología de ADN recombinante (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J etc. (1986) Immunobiology (Immunobiol) 72: 213-224), que es el producto del gen de EPO humana clonada en células de ovario de hámster chino (células CHO) y expresada en su interior. La EPO humana de origen natural se traduce en primer lugar en cadenas polipeptídicas que contienen 166 aminoácidos con la posición 166 siendo arginina. En las modificaciones postraduccionales la arginina en la posición 166 se degrada usando hidroxilo peptidasa. El peso molecular de EPO humana sin glucosilo es 18236Da. En la molécula de EPO intacta, el glucosilo supone aproximadamente el 40% del peso molecular total (J. Biol. Chem. 262: 12059).

La EPO es la primera citoquina aplicada en clínica y con mucho la preparación que incrementa la hemoglobina mejor conocida con un efecto sencillo y seguro. Tiene cierto efecto para anemia renal, anemia aplásica, mieloma múltiple, y hematuria paroxística nocturna; además, la aplicación de EPO puede reducir la cantidad de transfusión de sangre en la cirugía y en cierta medida curar la anemia causada por un tumor maligno, quimioterapia y artritis reumatoide. Dado que la EPO es generada principalmente por células endoteliales tubulares renales, la anemia causada por nefropatía es la primera indicación de EPO; la eficacia curativa de EPO sobre la anemia renal es casi del 100%, pero lo EPO no mejora la función renal. El tratamiento con EPO es seguro, eficaz y adecuado para tratar a largo plazo; Además, aborda el problema de escasez de suministro de sangre. En los mercados de fármacos biotecnológicos globales en 2006, los fármacos recombinantes de EPO supusieron 11,9 mil millones de dólares estadounidenses. Existe un enorme volumen de mercado.

Ya en 1989, la EPO humana recombinante (EPOGEN) fue aprobada por la FDA estadounidense para el tratamiento de anemia renal, pero es solamente desde 1992 que EPOGEN entró en el mercado chino. La morbilidad anual de nefritis crónica es de aproximadamente el 0,25% en China, de la cual una proporción considerable de pacientes desarrollará eventualmente insuficiencia renal. El número de pacientes con anemia renal es de aproximadamente 500-600 mil cada año. Además estimaciones conservadoras de consumo junto con el consumo en otra anemia relacionada con cáncer, el volumen de mercado doméstico es de aproximadamente 1,2-1,6 mil millones o aún más (calculado con el precio actual siendo 30-40 yuanes chinos/dosis, siendo el peso promedio de los pacientes 50 kg). A partir de finales de los 1990, la EPO se ha clasificado como el fármaco de mejores ventas en las principales ciudades de China. La cantidad de consumo es de 62,13 millones de yuanes en hospitales de muestra de las principales ciudades en toda China en 2003, con una clasificación de NO.56. El gasto en EPO en hospitales de muestra de las principales ciudades en toda China se incrementó hasta 80,49 millones de yuanes chinos en 2004, con un incremento de año a año del 30%.

Como una hormona endógena que actúa sobre las células hematopoyéticas de la médula para promover proliferación, diferenciación y maduración definitiva de células progenitoras eritroides, la EPO desempeña un importante papel en la regulación del estado de oxigenación del cuerpo. En la fase embrionaria temprana, la EPO es generada por el hígado y a continuación se desplaza gradualmente al riñón. La EPO es secretada principalmente por células intersticiales tubulares renales después del nacimiento.

Durante la inducción de diferenciación de progenitores de glóbulos rojos por EPO, se induce la globulina, lo que permite a las células reclutar más hemoglobina con función de síntesis de hierro, que puede combinarse con el oxígeno en glóbulos rojos maduros; por lo tanto, los glóbulos rojos y la hemoglobina desempeñan un importante papel en el suministro de oxígeno al cuerpo. Este ciclo es causado por la interacción entre EPO y el receptor en

superficie de la célula progenitora de glóbulos rojos.

5 Cuando el cuerpo está en estado sano, el tejido puede obtener oxígeno suficiente de glóbulos rojos ya existentes. En este momento, la concentración de EPO en el cuerpo es muy baja. Esta baja aunque normal concentración de EPO es suficiente para estimular para promover la generación de glóbulos rojos, que normalmente se pierde durante el envejecimiento.

10 Cuando el nivel de transporte de oxígeno por los glóbulos rojos en el sistema circulatorio se reduce y aparece la hipoxia, la cantidad de EPO en el cuerpo se incrementará. El estado de hipoxia del cuerpo puede ser causado por las siguientes razones: radiación excesiva, captación de oxígeno reducida debido a elevada latitud o coma de larga duración, diversos tipos de anemia y así sucesivamente. Como respuesta al estrés por hipoxia del cuerpo, un nivel más elevado de EPO puede estimular la diferenciación de célula progenitora de glóbulos rojos para intensificar su capacidad de producir glóbulos rojos. Cuando el número de glóbulos rojos en el cuerpo supera la necesidad de tejido normal, el nivel de EPO en el sistema circulatorio se reduce. Es precisamente debido a que la EPO tiene un papel crucial para la formación de glóbulos rojos que estas hormonas tienen un muy amplio prospecto para el tratamiento y el diagnóstico de una enfermedad de la sangre caracterizada por baja generación y defecto de glóbulos rojos. Recientes estudios proporcionan las bases para predecir el efecto de terapia con EPO en diversas enfermedades, trastornos y anomalías hematológicas, incluyendo estas enfermedades: el uso de EPO en el tratamiento de anemia en paciente con insuficiencia renal crónica (IRC), y administración de EPO a pacientes con SIDA y que reciben quimioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI: editado por MB, Garnick, EPO in Clinical Applications-An International Perspective. Marcel Dekker; 1990: páginas. 301-324).

20 Parte de los efectos biológicos de EPO pueden regularse mediante el papel interno de receptores superficiales en la membrana celular. Previamente, cuando se estudiaba la unión de la proteína EPO a la superficie celular usando glóbulos rojos inmaduros aislados del bazo de ratones, se descubrió que esta proteína está compuesta por dos polipéptidos, y su peso molecular es de aproximadamente 85000~100000 KD (véase Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 84: 3690-3694 para una descripción más detallada). El número de sitios de unión de EPO ya ha sido calculado. Cada membrana celular contiene aproximadamente de 800 a 1000 sitios. En estos sitios de unión, aproximadamente 300 sitios de unión tienen un nivel de Kd de 90 pM. La unión de los sitios de unión restantes es débil, siendo de aproximadamente 570 pM. Algunos estudios han mostrado que, a partir de la respuesta a EPO de glóbulos rojos del bazo de ratones infectados con la cepa de anemia del virus Friend, se identifican aproximadamente 400 sitios de unión, en los que algunos tienen un nivel de Kd alto de 100 pM y algunos tienen un nivel de Kd bajo de 800 pM.

30 El trabajo subsiguiente es que dos tipos de receptor de EPO son transcritos por un único gen. Dicho gen ha sido clonado ahora. Por ejemplo, las secuencias de ADN y secuencias que codifican péptidos del receptor de EPO de ratón y humano se han descrito en el documento WO90/08822. El modelo actual muestra que la unión de EPO al receptor de EPO causa la activación y la dimerización de dos receptores de EPO. Esta dimerización causa además el inicio de la señalización.

35 La aplicación del gen clonado de EPO es útil para descubrir agonistas y antagonistas de estos importantes receptores. El péptido que puede actuar en cierta medida sobre el receptor de EPO ha sido identificado y descrito. Especialmente, un grupo de péptidos que contienen el fragmento peptídico fundamental han sido identificados, que pueden unirse al receptor de EPO y estimular la diferenciación y proliferación de células EPO. Sin embargo, La CE50 del péptido que puede estimular la diferenciación y proliferación de células EPO es muy baja, variando entre 20 nM y 250 nM. Por lo tanto, las aplicaciones clínicas de estos péptidos están muy limitadas. Para superar las deficiencias de las tecnologías existentes, la presente invención proporciona un derivado peptidomimético de EPO con mejor actividad biológica y mayor biodisponibilidad, así como sus sales farmacéuticas y su método de preparación.

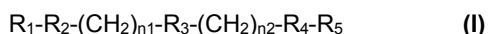
40 Por ejemplo, los documentos WO2004/101606 y WO2006/062685 describen compuestos peptídicos que son agonistas del receptor de eritropoyetina y aplicaciones terapéuticas para tratar trastornos asociados con producción de glóbulos rojos insuficiente o defectuosa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

50 La presente invención pretende proporcionar un derivado peptidomimético de EPO con mejor actividad biológica y biodisponibilidad más elevada, así como sus sales farmacéuticas y su método de preparación.

La invención también pretende proporcionar una composición farmacéutica que comprende el derivado peptidomimético de EPO mencionado anteriormente y sus sales farmacéuticas, para uso en el tratamiento de trastornos caracterizado por bajo nivel de EPO o población de glóbulos rojos insuficiente o defectuosa.

55 La invención desvela un derivado peptidomimético de EPO de fórmula general (I) y sus sales farmacéuticas con actividad biológica *in vivo*,



en la que R_1 , R_5 son como se definen en las reivindicaciones adjuntas y en la que n_1 , n_2 son números enteros seleccionados independientemente entre 0~10; R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO o -CH₂; R_3 se selecciona entre NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆, CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆, o CHSCON(CH₂)_{n₅}NHR₆; en las que n_4 es un número entero seleccionado entre 2~10, n_5 es un número entero seleccionado entre 2~10, R_6 se selecciona entre H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

5

En este aspecto, existen cuatro realizaciones preferidas:

[1] n_1 , n_2 son 2, R_2 , R_4 , son -CO, R_3 es CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆, n_5 es 2, R_6 es H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

[2] n_1 , n_2 son 1, R_2 , R_4 son -CO, R_3 es NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆, n_4 es 2, R_6 es H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

10

[3] n_1 , n_2 son 2, R_2 , R_4 son -CH₂, R_3 es CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆, n_5 es 2, R_6 es H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

[4] n_1 , n_2 son 1, R_2 , R_4 son -CH₂, R_3 es NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆, n_4 es 2, R_6 es H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

Las cuatro realizaciones preferidas mencionadas anteriormente son en paralelo, no estando relación inclusiva o progresiva.

15

Las cuatro realizaciones preferidas mencionadas anteriormente pueden optimizarse adicionalmente, R_6 es derivados de metoxi-polietilenglicol, de la forma más preferente R_6 es derivados de metoxi-polietilenglicol, en los que el peso molecular de los derivados de metoxi-polietilenglicol es de 5.000 a 100.000 Daltons, la estructura de los derivados de metoxi-polietilenglicol se selecciona entre el tipo ramificado o lineal.

En este aspecto, a través de optimización exhaustiva adicional pueden obtenerse las siguientes cuatro realizaciones preferidas:

20

[1] n_1 , n_2 son 2, R_1 , R_5 se seleccionan entre SEC ID N° 1~SEC ID N° 8, R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO, -CH₂, R_3 es CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆, en el que n_5 se selecciona entre 2~10, preferentemente 2; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y un peso molecular de 20.000 daltons.

25

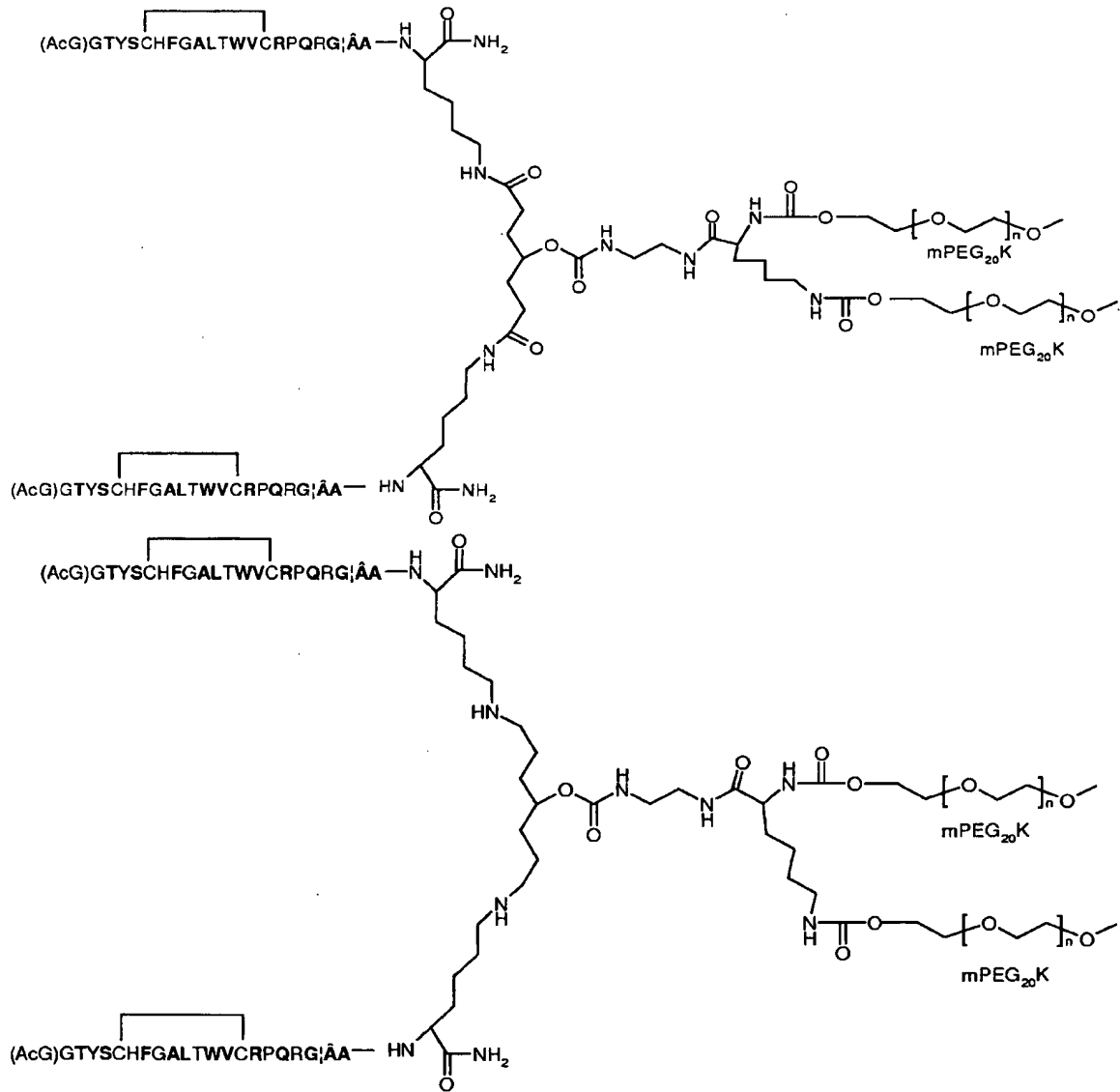
[2] n_1 , n_2 son 1, R_1 , R_5 se seleccionan entre SEC ID N° 1~SEC ID N° 8, R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO, -CH₂, R_3 es NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆, en el que n_4 se selecciona entre 2~10 y preferentemente 2; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y un peso molecular de 20.000 daltons.

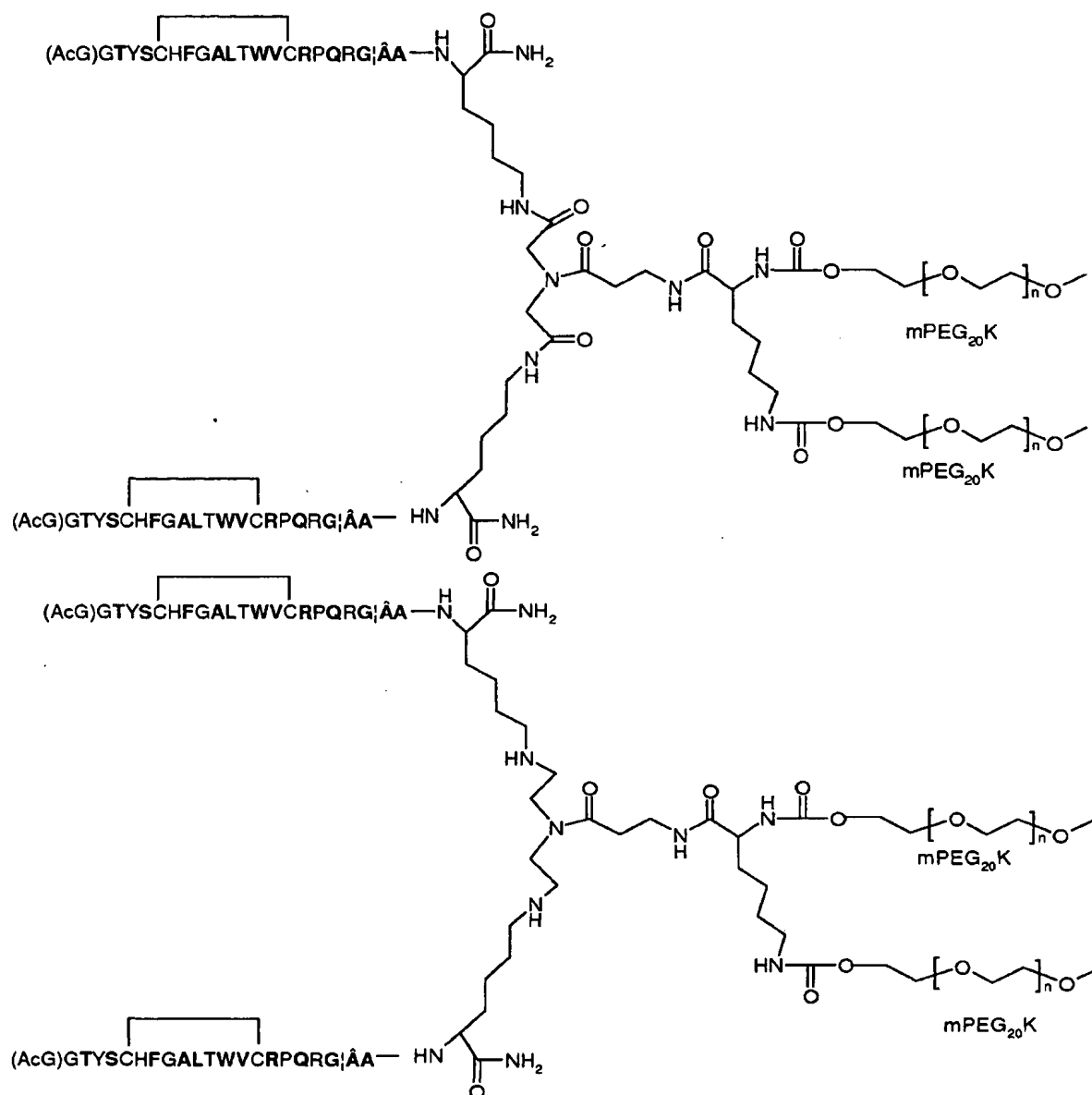
[3] n_1 , n_2 son 2, R_1 , R_5 se seleccionan entre SEC ID N° 1~SEC ID N° 8, R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO, -CH₂, R_3 es CHOCONH(CH₂)_{n₅}NHR₆, en el que n_5 se selecciona entre 2~10 y preferentemente 2; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y un peso molecular de 40.000 daltons.

30

[4] n_1 , n_2 son 1, R_1 , R_5 se seleccionan entre SEC ID N° 1~SEC ID N° 8, R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO, -CH₂, R_3 es NCO(CH₂)_{n₄}NHR₆, en el que n_4 se selecciona entre 2~10 y preferentemente 2; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y un peso molecular de 40.000 daltons.

La estructura de los derivados peptidomiméticos de EPO más preferidos y su sal farmacéutica se selecciona entre:





Los derivados peptidomiméticos de EPO proporcionados en el presente documento son compuestos anfífilos, que pueden formar sales reaccionando con compuestos ácidos o alcalinos a través de tecnología conocida habitualmente por un experto en la materia. Los ácidos usados habitualmente se seleccionan entre ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético; las sales formadas incluyen sulfato, pirofosfato, triflutato, sulfito, bisulfito, fosfato, bifosfato, dihidrofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, enantato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, benzoato de cloro, benzoato de metilo, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, fenilacetato, fenpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, γ -hidroxibutirato, glucolato, tartrato, metanosulfonato, propilsulfonato, naftalin-1-sulfonato, naftalin-2-sulfonato, mandelato y similares, preferentemente triflutato.

Las sustancias alcalinas también pueden reaccionar con derivados peptidomiméticos de EPO para generar sales. Estas sustancias alcalinas se seleccionan entre amonio, hidróxidos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, así como carbonato, bicarbonato, típicamente seleccionados entre hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de amonio, carbonato sódico, carbonato potásico y así sucesivamente.

La invención también desvela el método de preparación de los derivados peptidomiméticos de EPO mencionados anteriormente y sus sales farmacéuticas, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende:

(1) cantidades terapéuticas de los derivados peptidomiméticos de EPO mencionados anteriormente y sus sales farmacéuticas de la fórmula general (I);

(2) vehículo del fármaco farmacéuticamente aceptable.

5 La invención también desvela el uso de los fármacos, concretamente usando cualquiera de dichos derivados peptidomiméticos y sus sales farmacéuticas de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos caracterizados por bajo nivel de EPO o grupo de glóbulos rojos insuficiente o defectuoso, especialmente para el tratamiento de las siguientes enfermedades: insuficiencia renal avanzada o diálisis; anemia relacionada con el SIDA, enfermedades autoinmunitarias o tumor maligno; fibrosis quística; anemia temprana del prematuro; anemia relacionada con enfermedad inflamatoria crónica; lesión de la médula espinal; pérdida de sangre aguda; envejecimiento y cáncer con producción anormal de glóbulos rojos.

10 Los derivados peptidomiméticos de EPO y sus sales farmacéuticas proporcionados en la presente invención son capaces de promover de forma significativa el incremento de los recuentos de reticulocitos en sangre periférica de ratón, indicando que estimulan la eritropoyesis; al mismo tiempo también son capaces de prolongar en gran medida la semivida de los conjugados en el cuerpo. Los derivados peptidomiméticos de EPO y la proteína EPO no tienen influencia significativa sobre glóbulos rojos maduros, hematocrito de células sanguíneas, el contenido de hemoglobina, y tampoco tienen ninguna influencia significativa sobre el recuento de leucocitos periféricos.

15 Se usa síntesis en fase sólida para sintetizar monómeros peptidomiméticos de EPO, cuyo principio básico es: en primer lugar conectar el hidroxilo del aminoácido hidroxilo-terminal de la cadena peptídica a sintetizar con una resina polimérica insoluble mediante un enlace covalente. A continuación los aminoácidos unidos al vehículo de fase sólida se usan como el componente de aminoácido para prolongar la cadena polipeptídica a través de eliminación del grupo amino protector y reacción con el componente carboxilo activo excesivo. Repetir (condensación → lavado →desprotección→ lavado → la siguiente ronda de condensación) la operación hasta conseguir la longitud de cadena peptídica sintética deseada. Finalmente, la cadena peptídica se elimina de la resina. Después de un tratamiento de purificación, se produce el péptido deseado. El control medio de las etapas de reacción de condensación y desprotección aprovecha el método de detección con Ninhidrina, concretamente cuando la cadena peptídica en la resina tiene un amino libre, aparecerá un color azul después de la tinción con el reactivo ninhidrina. Cuando no hay amino libre, no se desarrollará reacción de color (siendo el propio reactivo de ninhidrina amarillo). Por lo tanto, después de llevar a cabo la reacción de condensación y detección mediante ninhidrina, si está presente el color amarillo (el color del propio reactivo de ninhidrina), esto significa que esta etapa de acoplamiento está completa y puede llevarse a cabo la operación de desprotección antes del acoplamiento del siguiente aminoácido. Si está presente color azul, esto significa que sigue habiendo algún amino libre en la cadena peptídica. Se necesita un acoplamiento repetido o cambiar el actual agente de condensación hasta que la resina-péptido presente un color amarillo después de la detección mediante ninhidrina.

20 El método de ciclación de péptido monomérico es bien conocido por un experto en la materia. La ciclación de puentes disulfuro es principalmente a través de la oxidación del sulfhidrilo en la cadena lateral del aminoácido del péptido monomérico en puentes disulfuro por el oxidante. Específicamente, los péptidos monoméricos se colocan en solución de DMSO o solución de bicarbonato de amina al 5% para autooxidarse, o añadirse a una solución de ácido acético que contenía I₂ a oxidar, preferentemente añadirse a una solución de ácido acético que contenía I₂ a oxidar. La ciclación del enlace amida es principalmente a través de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo y el grupo amino de la cadena lateral amino del péptido monomérico en presencia de agente de condensación. El agente de condensación añadido es bien conocido por un experto en la materia, incluyendo habitualmente DIC, EDC, HATU, Pybop etc.

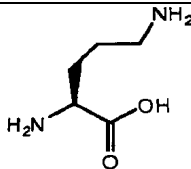
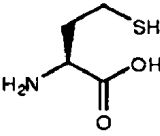
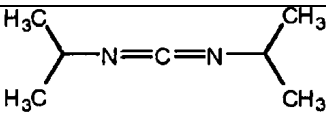
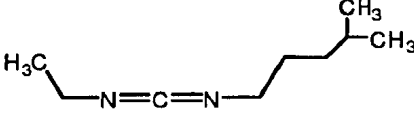
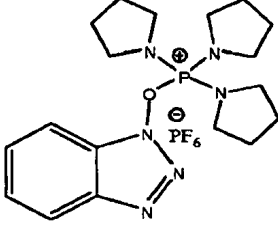
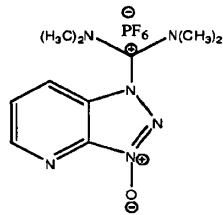
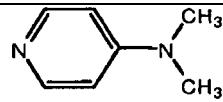
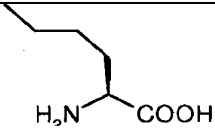
25 La síntesis del péptido dimérico es principalmente a través de la formación de enlace -NH-CH₂- o enlace -NH-CO- entre el amino de la cadena lateral del residuo de aminoácido del monómero peptidomimético de EPO y la molécula pequeña funcional. Un experto en la materia puede sintetizar fácilmente la molécula pequeña funcional y conectarla con el péptido cíclico del péptido monomérico a través de tecnología conocida.

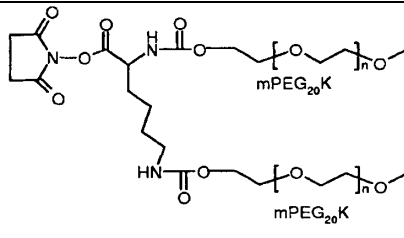
30 Se obtienen péptido dimérico y derivado de metoxi-polietilenglicol activo. El sistema de reacción puede seleccionarse entre disolvente orgánico o sistema tampón disponible. Cuando la reacción de PEGilación del péptido dimérico se lleva a cabo en disolvente orgánico, los siguientes álcalis pueden añadirse en la cantidad apropiada, incluyendo, aunque sin limitarse a, tales como trietilamina, diisopropil etilamina, piridina, 2,4,6-trimetil piridina. Cuando la reacción de derivatización de polietilenglicol se lleva a cabo en el sistema tampón, el sistema tampón puede seleccionarse entre diversos tampones disponibles conocidos, preferentemente tampón fosfato a pH 7,7.

35 La actividad biológica de EPO o derivados peptidomiméticos de EPO y sus sales farmacéuticas proporcionados por esta invención puede determinarse mediante diversos ensayos conocidos en este campo. La prueba de actividad *in vivo* se realiza de la siguiente manera: se inyecta por vía subcutánea a ratones con EPO y derivados peptidomiméticos de EPO y sus sales farmacéuticas proporcionados por esta invención en tres días consecutivos. A continuación se sacrifican los ratones. Se extrae la sangre completa para llevar a cabo recuento de células y reticulocitos de la sangre periférica. El recuento de células sanguíneas se realiza mediante un contador de células sanguíneas automático. El estudio de farmacodinámica se lleva a cabo mediante administración intravenosa a

macacos con una dosis de 1,35 mg/kg. La dosis de proteína EPO como fármaco de control es de 240 μ/kg. Los fármacos se administran tres veces a la semana y continúan durante seis semanas. Las muestras de sangre se recogen para llevar a cabo análisis del índice hematológico relacionados.

Resumen de abreviaturas usadas en la invención:

Abreviaturas	Nombre en español	Estructura
Om	L-Ornitina	
Hoc	L-Homocisteína	
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida	
EDC	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio	
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio Metanamino	
DMAP	4-Dimetilaminopiridina	
Nle	norleucina	

mPEG ₂ -OSU(40k)	Metioxi polietilenglicol N-hidroxisuccinimida ramificada (40k)	
-----------------------------	--	---

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la influencia de derivados peptidomiméticos de EPO (HH-EPO-018) sobre el hematocrito de macacos.

5 La figura 2 muestra la influencia de derivados peptidomiméticos de EPO (HH-EPO-018) sobre la hemoglobina de macacos.

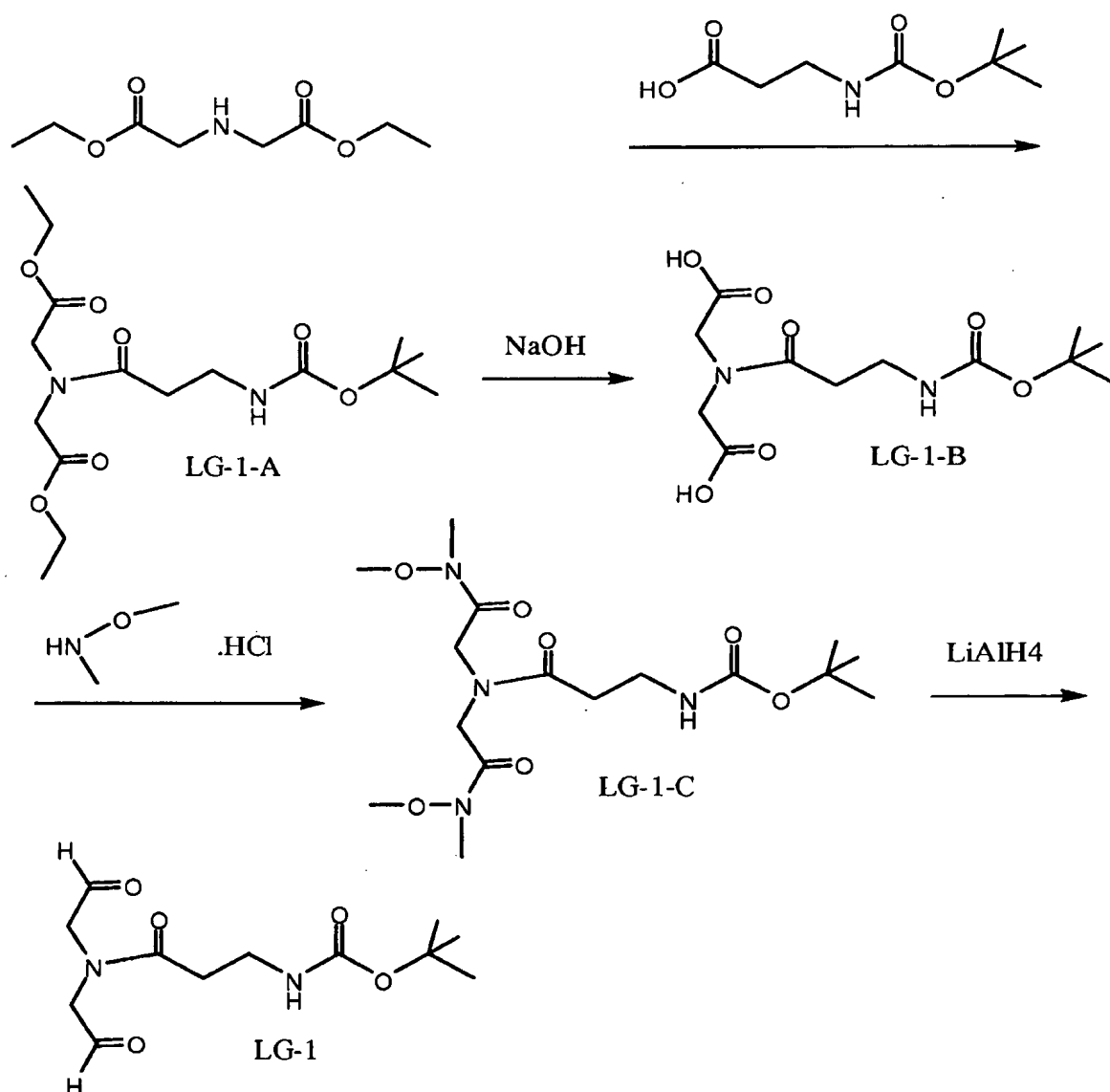
REALIZACIONES PREFERIDAS

Para una descripción más detallada de la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: síntesis de péptido monomérico peptidomimético de EPO

10 La síntesis de péptido monomérico peptidomimético de EPO se realiza mediante un método de síntesis peptídica en fase sólida. Este método de síntesis peptídica se ha descrito en muchas bibliografías, véase Stewart, J.M., y Young, J.D., *solid phase peptide synthesis 2d edition, novabiochem peptide synthesis notes*. El péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO proporcionado por esta invención se realiza mediante métodos de síntesis manual. La resina es resina rink amida. El α -amino de los derivados de aminoácidos están protegidos por Fmoc (fluoreno-formil carbonilo). El grupo tiol de la cadena lateral de cisteína, el grupo amino de la cadena lateral de glutamina y el grupo imidazol de la cadena lateral de histidina están protegidos por Trt (trilito). El grupo guanidina de la cadena lateral de arginina está protegido por Pbf (2,2,4,6,7-Pentametilidihydrobenzofuran-5-sulfonilo). El grupo indol de la cadena lateral de triptófano y el grupo amino de la cadena lateral de lisina están protegidos por Boc (terc-Butoxicarbonilo). El grupo hidroxilo de la cadena lateral de treonina, el grupo fenol de la cadena lateral de tirosina, el grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina están protegidos por tBu (terc-butilo). El carboxilo del C-terminal de la cadena peptídica del péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO a sintetizar está unido a una resina insoluble (resina rink amida) mediante un enlace covalente. A continuación los aminoácidos unidos al vehículo de fase sólida se usan como componente amino para prolongar la cadena polipeptídica después de eliminar los grupos de protección amino mediante una solución de piperidina al 20% / DMF y reacción con el derivado de aminoácido excesivo. Repetir (condensación \rightarrow lavado \rightarrow desprotección \rightarrow lavado \rightarrow la siguiente ronda de condensación) la operación hasta conseguir la longitud de la cadena peptídica sintética deseada. Finalmente, la cadena peptídica se elimina de la resina usando una solución mixta de ácido trifluoroacético, agua, etilmercaptano, 3-isopropilsilano (92,5: 2,5: 2,5: 2,5). Después de la sedimentación en éter, se obtiene el péptido monomérico impuro de derivado peptidomimético de EPO. El péptido monomérico impuro se separa y se purifica mediante columna preparativa de fase inversa de C18. A continuación se obtiene el péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO. El control medio de las etapas de reacción de condensación y desprotección explota el método de detección con Ninhidrina, concretamente cuando la cadena peptídica de resina tiene amino libre, un color azul aparecerá después de tefir con el reactivo ninhidrina. Cuando no hay amino libre, no se desarrollará ninguna reacción de color (siendo el propio reactivo de Ninhidrina amarillo). Por lo tanto, después de llevar a cabo la reacción de condensación y detección mediante ninhidrina, si el color amarillo está presente (el color del propio reactivo de ninhidrina), esto significa que esta etapa de acoplamiento se completa y la operación de desprotección antes del acoplamiento del próximo aminoácido puede llevarse a cabo. Si el color azul está presente, esto significa que sigue habiendo algún amino libre en la cadena peptídica. Se necesita un acoplamiento repetido adicional o cambiar el actual agente de condensación hasta que la resina-péptido presente un color amarillo después de la detección mediante ninhidrina.

40 **Ejemplo 2: Preparación de pequeñas moléculas funcionales (LG-1)**



Etapas 1: preparación de LG-1-A

5 Disolver éster dietílico del ácido iminodiacético (10,0 g, 52,8 mmoles), Boc-β-alanina (10,0 g, 52,8 mmoles) en 100 ml de diclorometano, añadir DIC (8,0 ml, 52,8 mmoles), agitarlo a temperatura ambiente durante una noche, filtrar la solución de reacción, lavar el filtrado con 100 ml de NaHCO₃ saturado, 50 ml de solución de HCl 0,5 N, 100 ml de solución salina saturada por turnos, separar la capa orgánica, secar la capa orgánica con MgSO₄ anhidro. Filtrar la capa orgánica, concentrarla, y obtener una sustancia líquida oleosa incolora LG-1-A: 17 g.

Etapas 2: preparación de LG-1-B

10 Disolver 17g de LG-1-A en 100 ml de MeOH:THF = mezcla 1:1, y a continuación añadir 25 ml de agua, 5 g de NaOH (125 mmoles). Ajustar el valor de pH a 1 con solución de HCl 6 N después de 2 h de agitación a temperatura ambiente. Extraer la solución de reacción con acetato de etilo cuatro veces. La capa orgánica se lava con solución salina, se seca mediante sulfato de magnesio anhidro, se concentra a presión reducida para producir un semisólido blanco. Disolver los productos en 50 ml de diclorometano, y añadir 300 ml de n-hexano. La solución es una pasta blanca. Después de la concentración a presión reducida se obtiene un sólido blanco LG-1-B: 14 g (el rendimiento es de aproximadamente el 90%).

Etapas 3: Preparación de LG-1-C

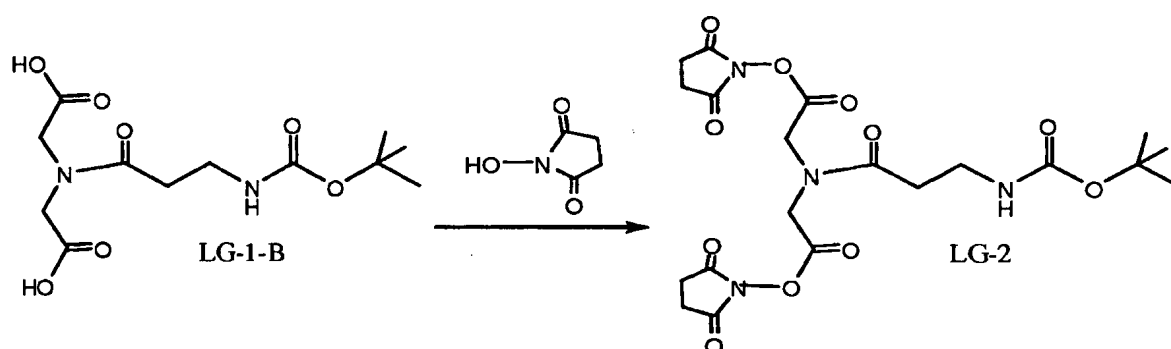
15 Disolver 7 g de LG-1-B (23 mmoles) en 80 ml de tetrahidrofurano, y añadir con agitación 4,6 g de clorhidrato de N,N-metoxi-metil-amina (46 mmoles) y 5,1 g de trietilamina (51 mmoles), y a continuación añadir 4,4 g de DIC (32 mmoles), 4,7 g de HOBT (32 mmoles). Agitar la reacción durante una noche a temperatura ambiente. Al día

siguiente, el líquido de reacción se añade al agua y se extrae mediante 350 ml de acetato de etilo. La capa orgánica se lava mediante 200 ml de solución acuosa de HCl 2 N, 200 ml de solución saturada de bicarbonato sódico, 100 ml de solución salina saturada por turnos. La capa orgánica se separa y se seca con sulfato de magnesio anhidro durante 2 horas y a continuación se filtra. El filtrado se convierte en una sustancia oleosa después de concentración a presión reducida. Después de cromatografía en columna, se recoge el producto diana LG-1-C: 4,2 g, rendimiento: 70%.

Etapa 4: Preparación de LG-1

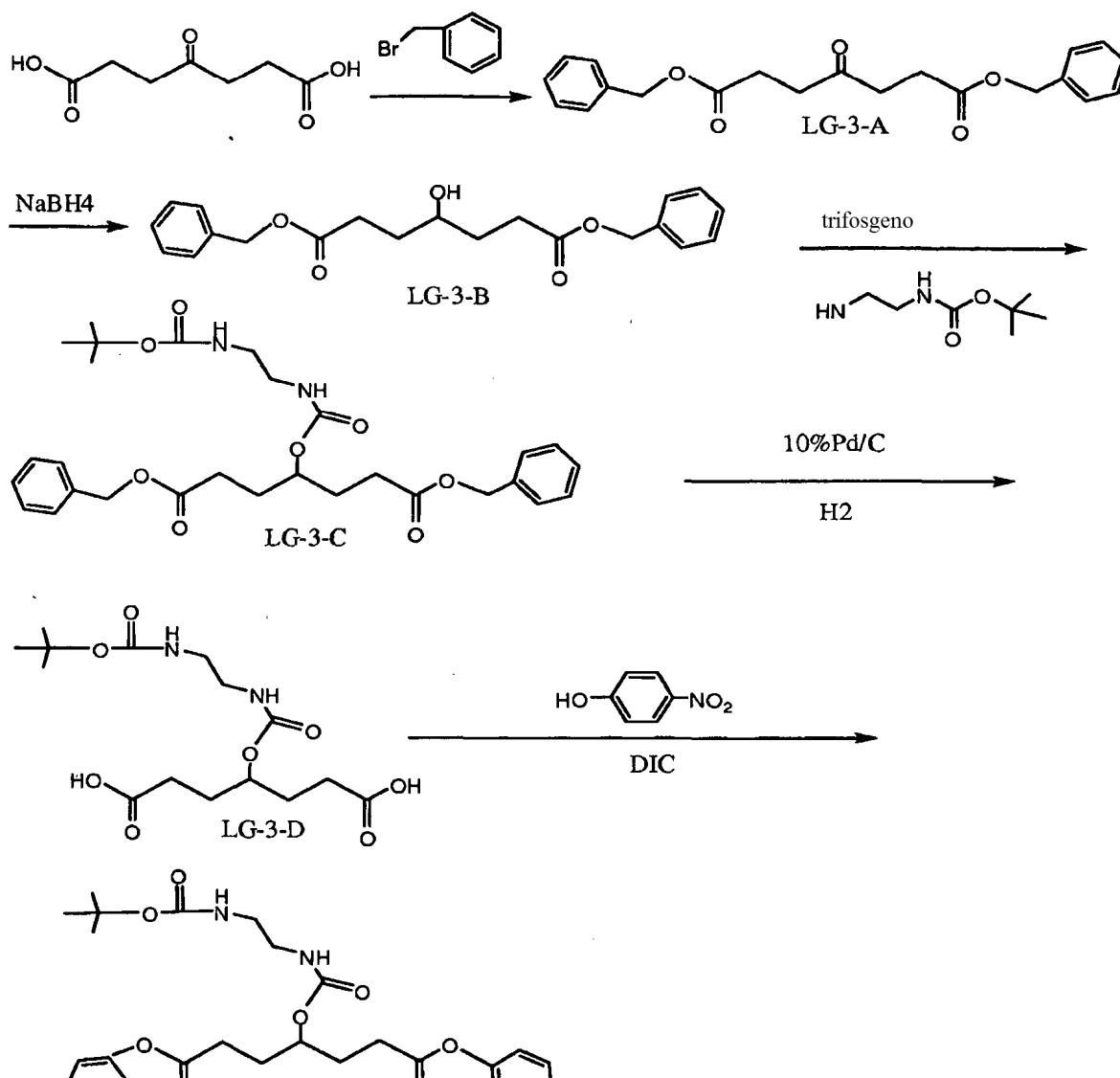
Disolver 4,0 g de LG-1-C (10,2 mmoles) en 60 ml de tetrahidrofurano, refrigerarlo a 0°C mediante un baño de sal con hielo. Añadir LiAlH₄ (340 mg, 8,9 mmoles). Después de la reacción a 0°C durante 30 minutos, añadir 4 ml de agua, 4 ml de solución de NaOH al 15% por turnos. Filtrar la solución de reacción. El filtrado se lava con tetrahidrofurano. Después de la concentración a sequedad y cromatografía en columna de gel de sílice, se obtiene LG-1: 1,63 g (6 mmoles, rendimiento: 58,8%)

Ejemplo 3: Preparación de pequeñas moléculas funcionales (LG-2)



Disolver 4 g de LG-1-B (13 mmoles) en 100 ml de N,N-dimetilformamida, y añadir hidroxisuccinimida (3,1 g, 21 mmoles), DIC (4 ml, 26 mmoles) y DMAP (4-dimetilaminopiridina) (12 mg, 0,08 mmoles). Después de agitar durante una noche, la solución de reacción se concentra a presión reducida. Disolver el residuo en 80 ml de acetato de etilo. Las sustancias insolubles se eliminaron por filtración. La fase orgánica se lava por turnos con 40 ml de solución saturada de bicarbonato sódico, 40 ml de solución salina saturada, 40 ml de solución de HCl 0,5 N, 40 ml de solución salina saturada una vez. La capa orgánica se separa y se seca mediante sulfato de magnesio anhidro. Filtrar la capa orgánica. El filtrado se concentra a presión reducida. Se obtiene un sólido blanco LG-2: 4,4 g (el rendimiento es de aproximadamente el 68%).

Ejemplo 4: Preparación de pequeñas moléculas funcionales (LG-3)



Etapa 1: Preparación de LG-3-A

5 Disolver 7,0 g de ácido pentanonapimémico (0,04 moles) en 100 ml de metanol. Añadir solución de CsCO₃ en metanol al 5% con agitación, y controlar la cantidad de adición para hacer que el pH de la solución de reacción sea de aproximadamente 8,5 (determinado mediante tira reactiva de pH exacta). Agitarlo durante 30 minutos después de completar la adición. A continuación filtrar la solución de reacción. El filtrado se convierte en una sustancia oleosa después de concentración al vacío. Disolver la sustancia oleosa en aproximadamente 100 ml de DMSO y calentar a 60°C. Añadir 14 g (0,08 moles) de bromuro de bencilo. Después de reacción durante 8 horas, filtrar la solución de reacción, lavar el sólido con una pequeña cantidad de éter. Añadir 400 ml de éter al licor madre, lavarlo con 200 ml de solución salina saturada. Separar la capa orgánica y secarla con sulfato de magnesio anhidro durante 2 horas. A continuación filtrarlo. Cuando el filtrado se concentra a presión reducida a 1/5 de su volumen original, se coloca en un congelador a -20°C durante una noche para cristalizar. Al día siguiente, filtrar los sólidos, secar y obtener un sólido blanco LG-3-A: 10,5 g (rendimiento 74%).

10

Etapa 2: Preparación de LG-3-B

Disolver 2 g de LG-3-A (0,0056 moles) en 20 ml de tetrahidrofurano. Mantener la temperatura interna de la solución por debajo de -10°C , agitarla y añadir 626 mg de NaBH_4 (0,0168 moles). Después de reacción durante 1 h, añadir 200 ml de éter enfriado, seguido por añadir 150 ml de solución saturada de bicarbonato sódico para finalizar la reacción. Mantener el resto para permitir la delaminación. La capa orgánica se lava una vez con solución salina saturada, y a continuación se seca con Na_2SO_4 anhidro durante 2 horas y se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida para producir LG-3-B: 1,9 g (rendimiento: 94,6%).

Etapa 3: Preparación de LG-3-C

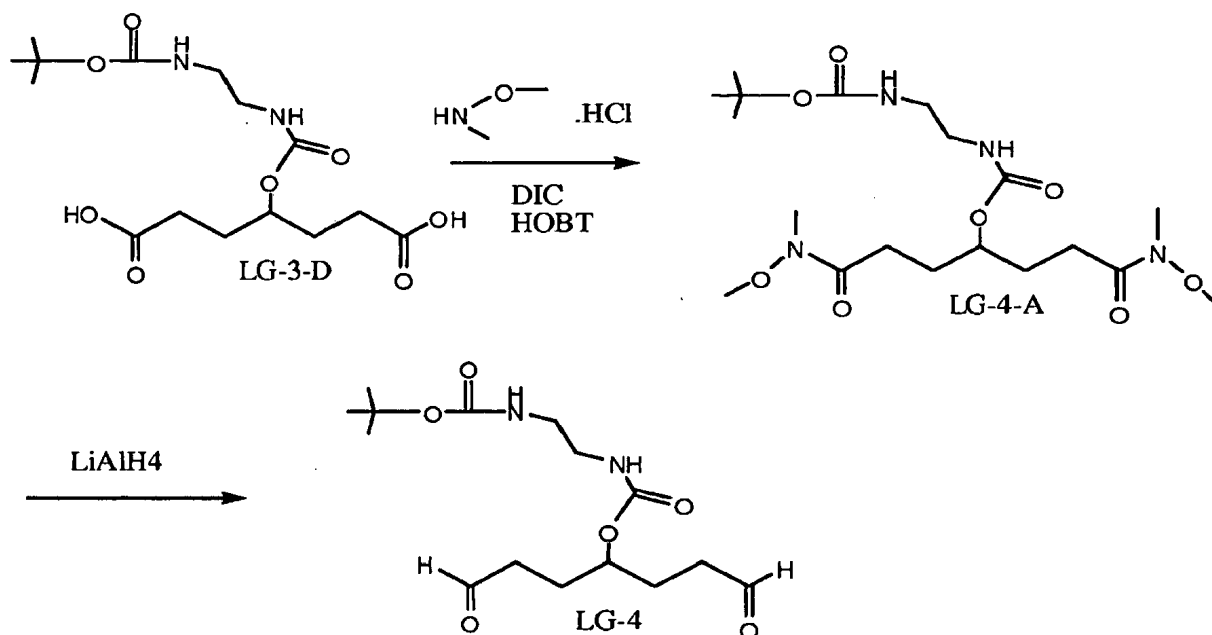
Disolver 3,2 g de LG-3-B (0,009 moles) en 50 ml de diclorometano. Añadir 4,34 g de trietilamina (0,043 moles) por debajo de 0°C con agitación. Disolver 1,33 g (0,0045 moles) de trifosgeno en 25 ml de diclorometano. A continuación añadirlo a la solución anterior gota a gota. Añadir 2,8 g de terc-Butoxicarbonil-etilendiamina después de 1 hora. Después de la reacción durante 3 h, la mezcla de reacción se ajusta a neutra con ácido acético glacial, y en ese momento se genera un precipitado. Eliminar el precipitado por filtración. El filtrado se concentra a presión reducida y a continuación se disuelve en éter. A continuación se lava con agua tres veces, con solución salina saturada una vez. La capa orgánica se separa y se seca con sulfato de magnesio anhidro durante 2 horas y a continuación se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida para hacerle oleoso. La sustancia oleosa se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (fase móvil: éter de petróleo: acetato de etilo = 10:1). El producto diana se combina y se recoge, y se concentra para producir un sólido blanco LG-3-C: 1,5 g (rendimiento 38,8%).

Etapa 4: Preparación de LG-3-D

Disolver 13 g de LG-3-C (0,031 moles) en 8 ml de metanol y añadir aproximadamente 200 mg de Pd-C al 10% con agitación. Después de reacción en H_2 a presión atmosférica durante 4 h, eliminar por filtración el carbón activado, y el filtrado se concentra para producir la sustancia oleosa LG-3-D: 8,28 g (rendimiento: 96,7%).

Etapa 5: Preparación de LG-3

Disolver 5 g de LG-3-D (0,018 moles) en 10 ml de tetrahidrofurano. Añadir 4,7 g de p-nitrofenol (0,043 moles), y añadir 4,2 g (0,043) de solución de DIC con agitación. Agitar la reacción durante una noche. Al día siguiente, eliminar por filtración el precipitado resultante, lavar la torta del filtro con una pequeña cantidad de acetato de etilo, secar el filtrado mediante concentración a presión reducida. Añadir 100 ml de acetato de etilo al residuo y hacer que se disuelva. Lavarlo con 50 ml de solución salina saturada una vez. Separar la capa orgánica y secarla con sulfato de magnesio anhidro durante 2 horas. A continuación filtrarla. Concentrar el filtrado a presión reducida para producir una sustancia oleosa. La sustancia oleosa se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: hexano/acetato de etilo 20:1 = 10:1). El producto diana se combina y se recoge, y se concentra a presión reducida a sequedad para producir un sólido blanco LG-3: 3,5 g (rendimiento: 32%).

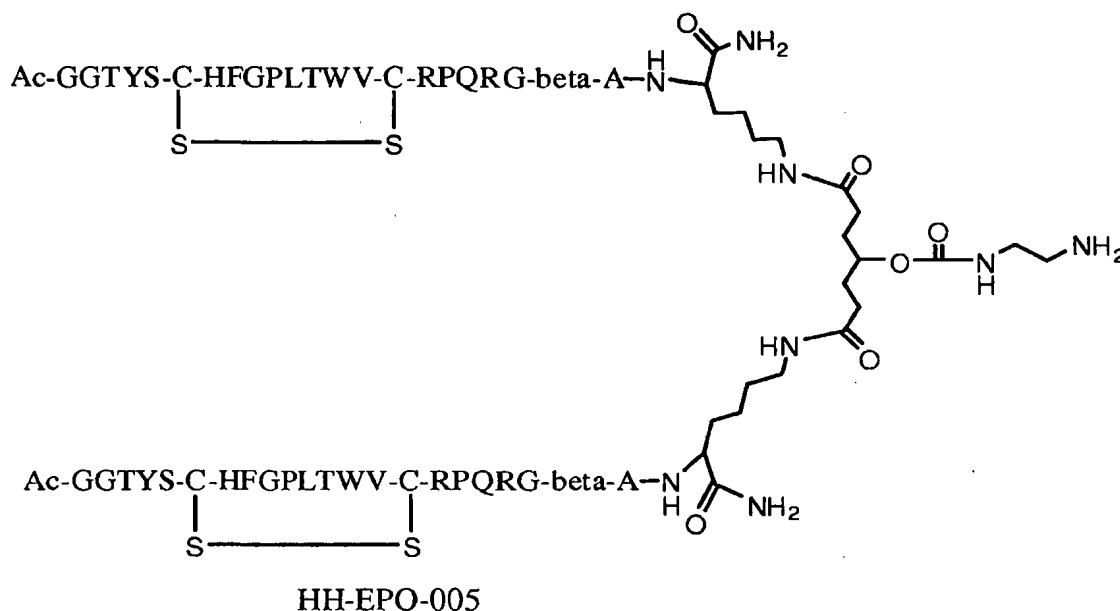
Ejemplo 5: Preparación de pequeñas moléculas funcionales (LG-4)**Etapa 1: Preparación de LG-4-A**

Disolver 5 g de LG-3-D (0,018 moles) en 60 ml de tetrahidrofurano. Añadir 3,51 g de clorhidrato N,N-metoxi-metilamina (0,036 moles) y 4,0 g de trietilamina (0,04 moles) con agitación. A continuación añadir 3,4 g de DIC (0,027 moles) y 3,65 g de HOBT (0,027 moles). Agitar la reacción durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, añadir la solución de reacción a 200 ml de agua, y extraerla con acetato de etilo dos veces, cada vez 200 ml. Combinar la capa orgánica. Lavarla por turnos con 50 ml de solución de HCl 2 N, 100 ml de solución saturada de NaHCO₃, 100 ml de solución salina saturada una vez. Separar la capa orgánica, secarla durante 2 horas con sulfato de magnesio anhidro. A continuación filtrarla. El filtrado se concentra a presión reducida para producir una sustancia oleosa. La sustancia oleosa se purifica mediante cromatografía en columna (eluyente: hexano/acetato de etilo 10:1). El componente diana se combina para producir un sólido blanco LG-4-A: 6,24 g (rendimiento: 80%).

Etapa 2: Preparación de LG-4

Disolver 4,0 g de LG-4-A (9 mmoles) en 50 ml de tetrahidrofurano. Añadir 300 mg de LiAlH₄ (7,9 mmoles) a la temperatura enfriada a por debajo de cero con un baño de hielo-sal. Mantener la reacción a 0°C durante 30 minutos. A continuación añadir 0,3 ml de agua, 0,9 ml de solución de NaOH al 15%, 0,3 ml de agua por turno, y en este momento se genera un precipitado. Eliminar por filtración el precipitado. La torta del filtro se lava con tetrahidrofurano una vez. El filtrado se combina y se concentra a presión reducida a sequedad. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna para producir 1,65 g de LG-4 (rendimiento: 55,5%).

Ejemplo 6: Preparación de HH-EPO-005



Etapa 1: Preparación de péptidos cíclicos de la SEC ID N° 5

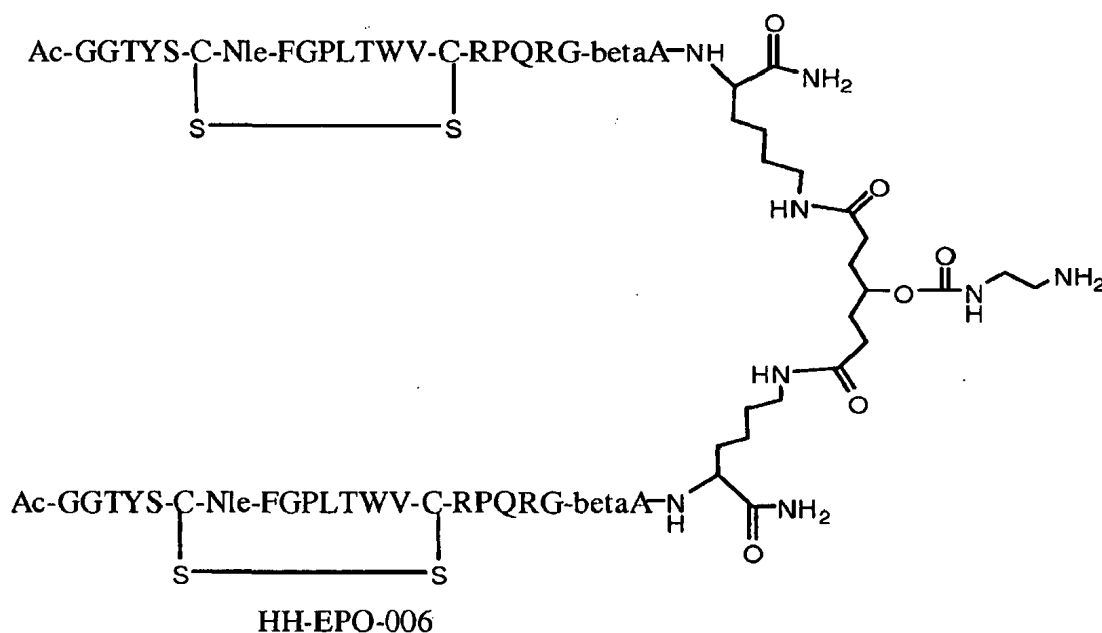
Disolver 9 g del péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO de la SEC ID N° 5 (síntesis de acuerdo con el método que se da en los Ejemplos) en 3000 ml de ácido acético glacial al 20%, y a continuación añadir lentamente solución de yodo en metanol al 5% gota a gota hasta que el color amarillo no desaparece. La solución de reacción se somete directamente a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se preparan 3,0 g de péptido cíclico de la SEC ID N° 5 mediante liofilización (rendimiento: 15,6%).

Etapa 2: Preparación de HH-EPO-005

Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 5 en 150 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 147 mg (1,46 mmoles) de trietilamina, 368 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-3) (0,61 mmoles). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas, concentrar parte de la N,N-dimetilformamida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. A continuación disolver este sólido blanco en 50 ml de solución de ácido trifluoroacético al 20%/diclorometano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, parte del disolvente se concentra a presión reducida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2

horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. El sólido blanco se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-005: 1,0 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 33%).

Ejemplo 7: Preparación de HH-EPO-006



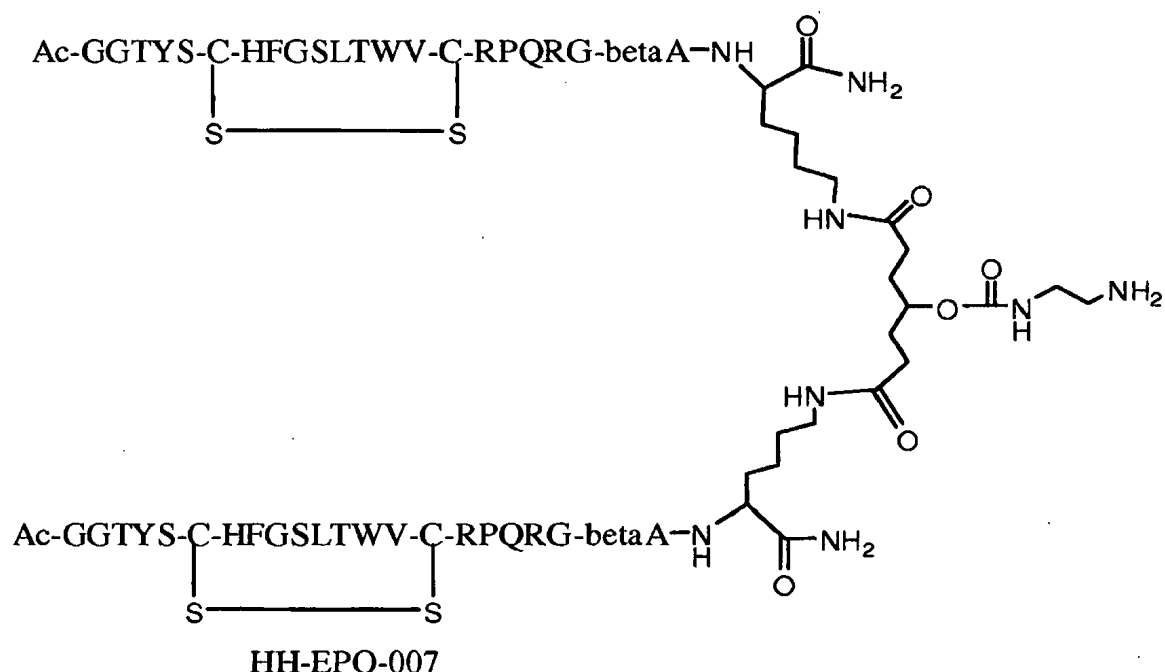
Etapa 1: Preparación de péptidos cíclicos de la SEC ID N° 6

Disolver 9 g del péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO de la SEC ID N° 6 (síntesis de acuerdo con el método que se da en los Ejemplos) en 3000 ml de ácido acético glacial al 20%, y a continuación añadir lentamente solución de yodo en metanol al 5% gota a gota hasta que el color amarillo no desaparece. La solución de reacción se somete directamente a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se preparan 3,0 g del péptido cíclico de la SEC ID N°6 mediante liofilización (rendimiento: 15,3%).

Etapa 2: Preparación de HH-EPO-006

Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 6 en 150 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 147 mg (1,46 mmoles) de trietilamina, 368 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-3) (0,61 mmoles). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas, concentrar parte del DMF. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. A continuación disolver este sólido blanco en 50 ml de solución de ácido trifluoroacético al 20%/diclorometano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, parte del disolvente se concentra a presión reducida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. El sólido blanco se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-006: 3,98 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 32,7%).

Ejemplo 8: Preparación de HH-EPO-007



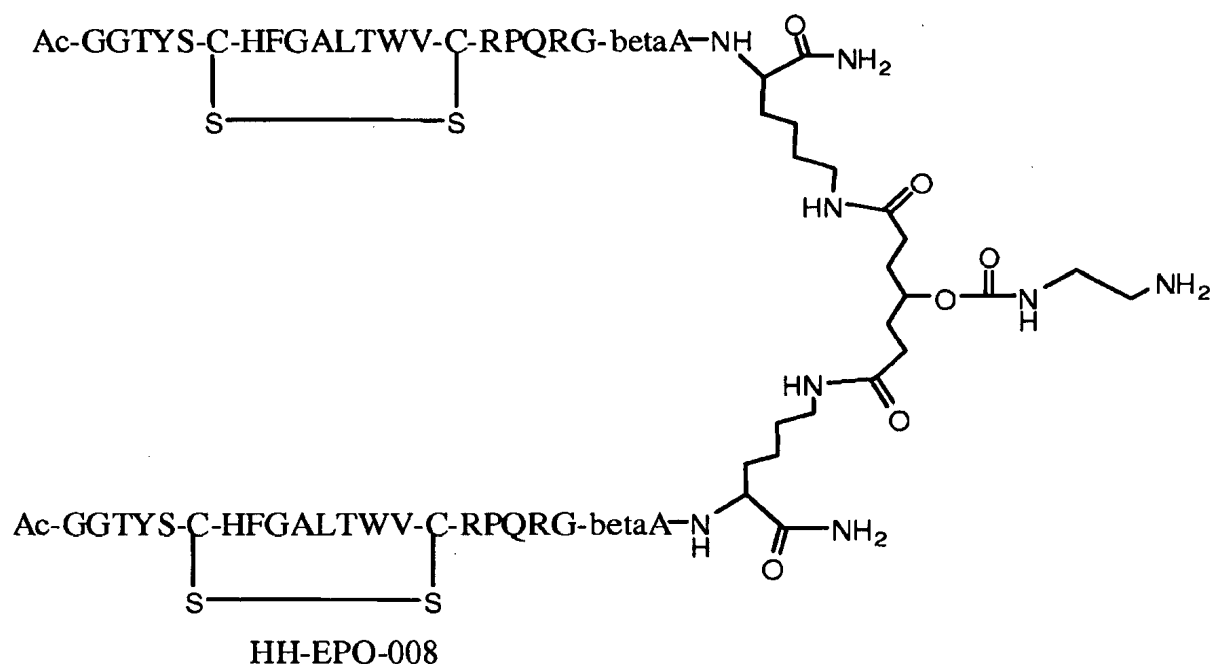
Etapa 1: Preparación de péptidos cíclicos de la SEC ID N° 7

5 Disolver 9 g del péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO de la SEC ID N° 7 (síntesis de acuerdo con el método que se da en los Ejemplos) en 3000 ml de ácido acético glacial al 20%, y a continuación añadir lentamente solución de yodo en metanol al 5% gota a gota hasta que el color amarillo no desaparece. La solución de reacción se somete directamente a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se preparan 3,15 g de péptido cíclico de la SEC ID N°7 mediante liofilización (rendimiento: 16,4%).

Etapa 2: Preparación de HH-EPO-007

15 Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 7 en 150 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 147 mg (1,46 mmoles) de trietilamina, 368 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-3) (0,61 mmoles). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas, concentrar parte de la N,N-dimetilformamida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. A continuación disolver este sólido blanco en 50 ml de solución de ácido trifluoroacético al 20%/diclorometano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, parte del disolvente se concentra a presión reducida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. El sólido blanco se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-007: 1,0 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 33%).

Ejemplo 9: Preparación de HH-EPO-008



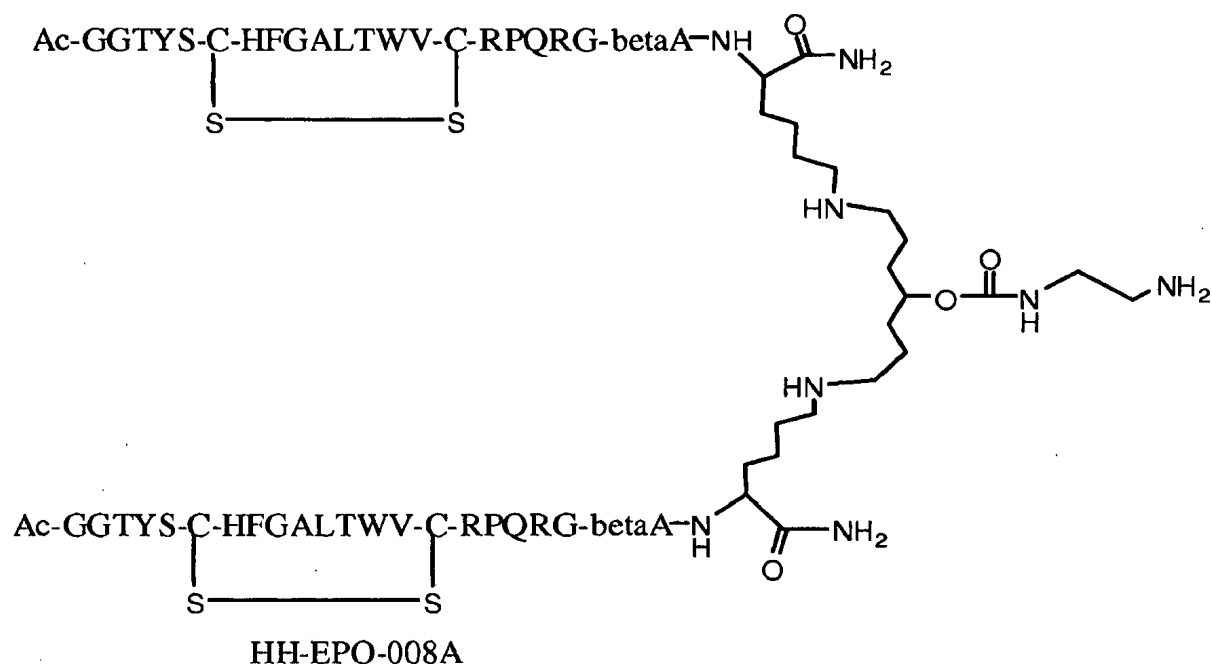
Etapas 1: Preparación de péptidos cíclicos de la SEC ID N°8

5 Disolver 27 g de péptido monomérico derivado peptidomimético de EPO de la SEC ID N° 8 (síntesis de acuerdo con el método que se da en los Ejemplos) en 3000 ml de ácido acético glacial al 20%, y a continuación añadir lentamente solución de yodo en metanol al 5% gota a gota hasta que el color amarillo no desaparece. La solución de reacción se somete directamente a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se preparan 9,3 g de péptido cíclico de la SEC ID N°8 mediante liofilización (rendimiento: 15,7%).

Etapas 2: Preparación de HH-EPO-008

15 Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 8 en 150 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 147 mg (1,46 mmoles) de trietilamina, 368 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-3) (0,61 mmoles). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas, concentrar parte de la N,N-dimetilformamida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. A continuación disolver este sólido blanco en 50 ml de solución de ácido trifluoroacético al 20%/diclorometano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, parte del disolvente se concentra a presión reducida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. El sólido blanco se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-008: 1,12 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 33%).

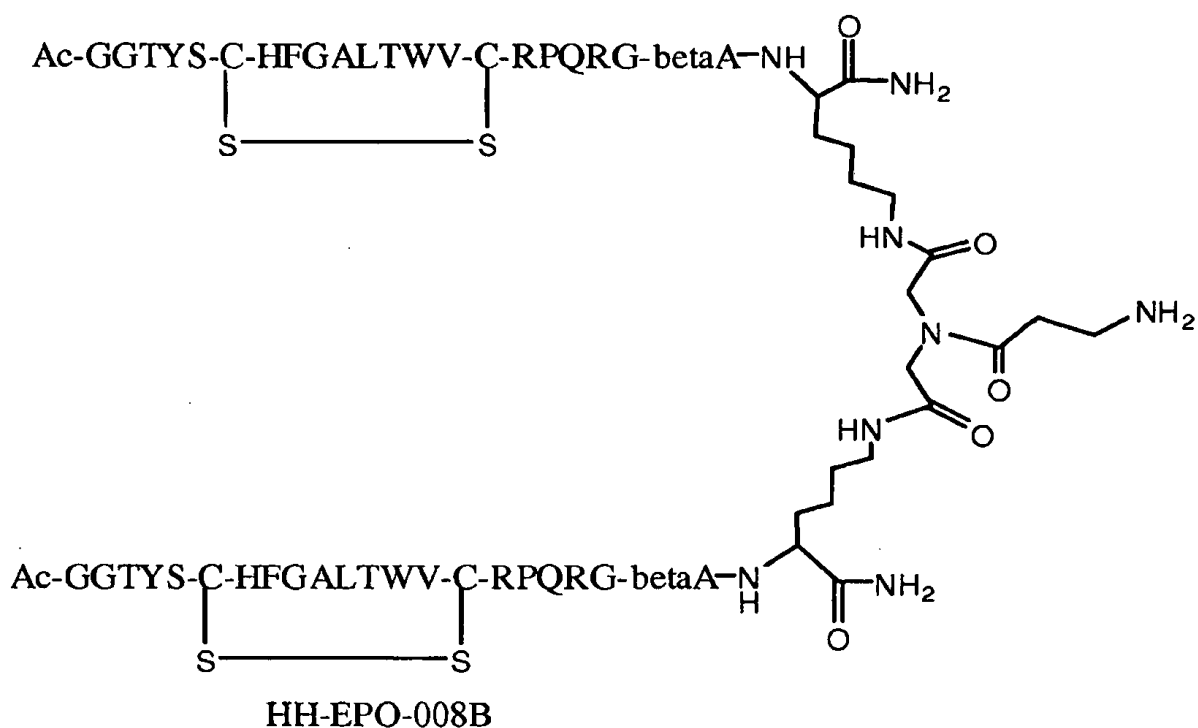
Ejemplo 10: Preparación de HH-EPO-008A



5 Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 8 en 150 ml de tampón de ácido acético a 20 mmoles (pH 5,0), y a continuación añadir 201 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-4) (0,61 mmoles) y 10 ml de acetonitrilo. Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución de reacción se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-008A: 0,75 g mediante liofilización (rendimiento: 25%).

10

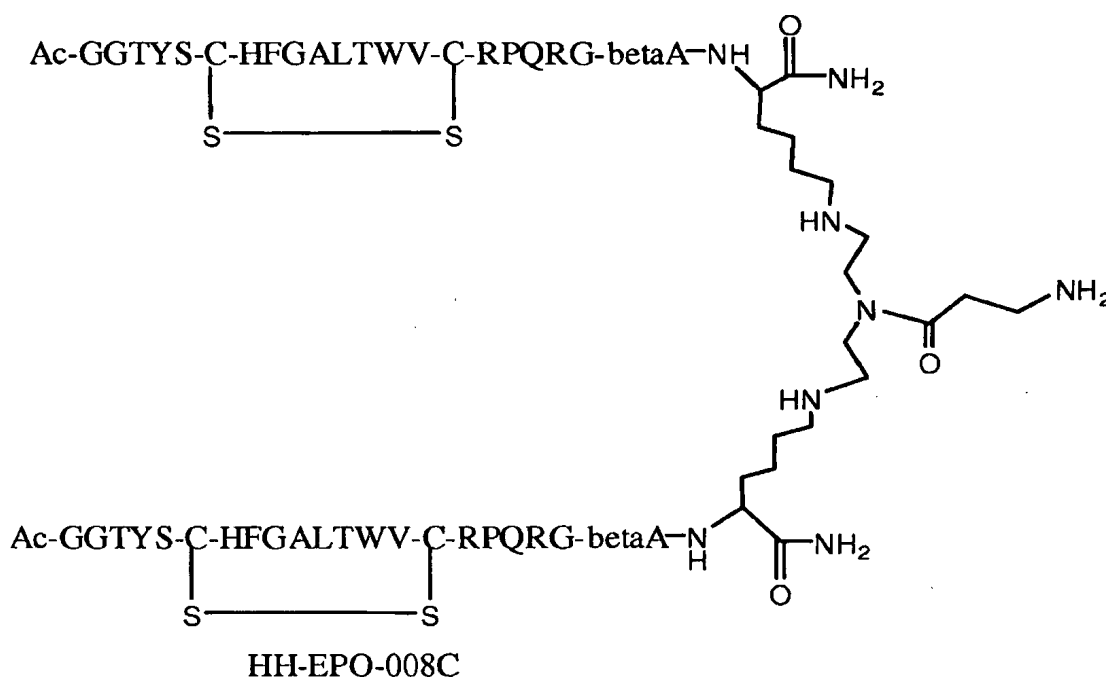
Ejemplo 11: Preparación de HH-EPO-008B



Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 8 en 150 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 147

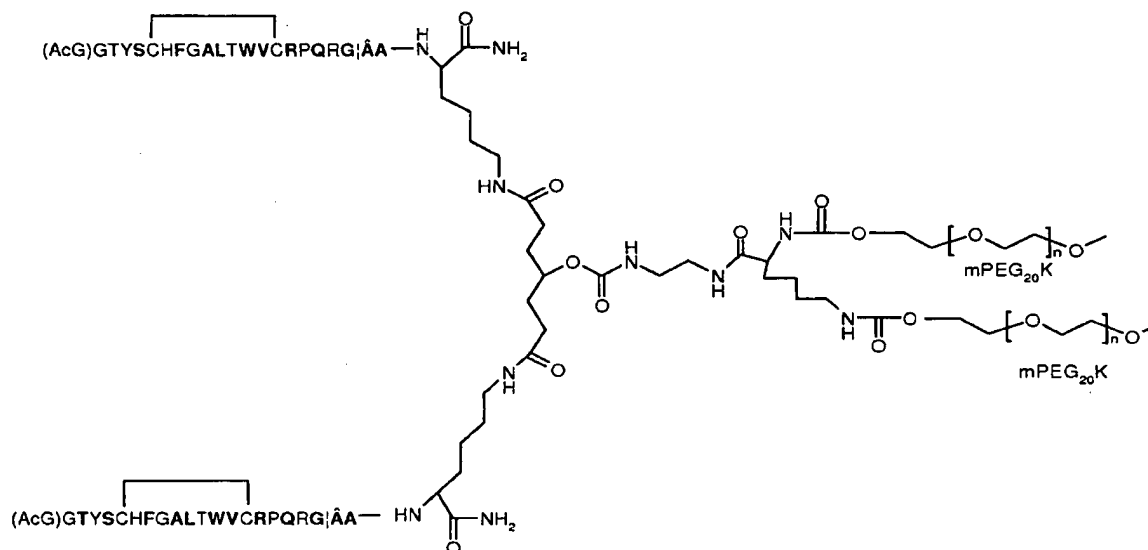
5 mg (1,46 mmoles) de trietilamina, 322 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-2) (0,61 mmoles). Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas, concentrar parte de la N,N-dimetilformamida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. A continuación disolver este sólido blanco en 50 ml de solución de ácido trifluoroacético al 20%/diclorometano. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, parte del disolvente se concentra a presión reducida. Añadir 200 ml de éter al residuo, colocarlo en el frigorífico durante 2 horas y a continuación centrifugar. Un sólido blanco se obtiene mediante secado al vacío. El sólido blanco se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-008: 1,3 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 43%).

15 Ejemplo 12: Preparación de HH-EPO-008C



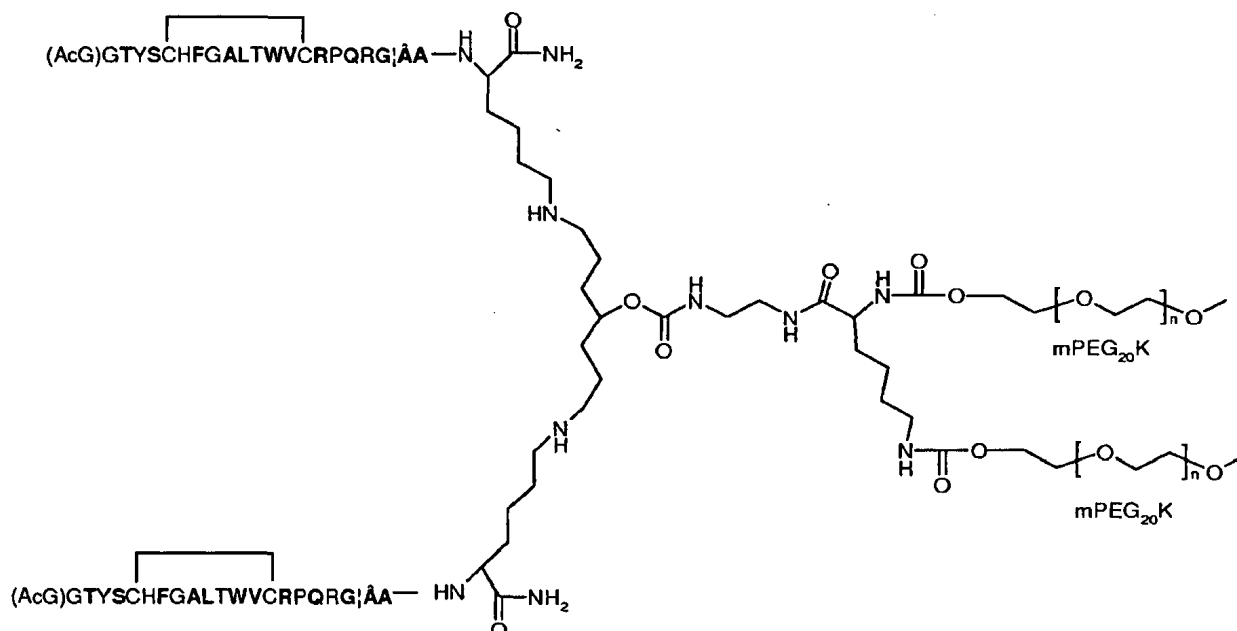
20 Disolver 3,0 g (1,22 mmoles) del péptido cíclico de la SEC ID N° 8 en 150 ml de tampón de ácido acético a 20 mmoles (pH 5,0), y a continuación añadir 165 mg de pequeñas moléculas funcionales (LG-1) (0,61 mmoles) y 10 ml de acetonitrilo. Después de agitar la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución de reacción se somete a purificación preparativa mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-008C: 0,8 g mediante liofilización (rendimiento: 27%).

25 Ejemplo 13: Preparación de HH-EPO-018



5 Disolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmoles) en 100 ml de N,N-dimetilformamida, añadir trietilamina 39,6 mg (0,196 mmoles), 3,8 g de mPEG₂-OSU(40K) (0,96 mmoles). Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Introducir la solución de reacción directamente en 600 ml de éter frío. El sólido precipita. Después de colocarlo en el frigorífico 2 horas, centrifugarlo y se obtiene HH-EPO-018 impuro mediante secado al vacío. El HH-EPO-018 se purifica mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-018: 1,8 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 47%).

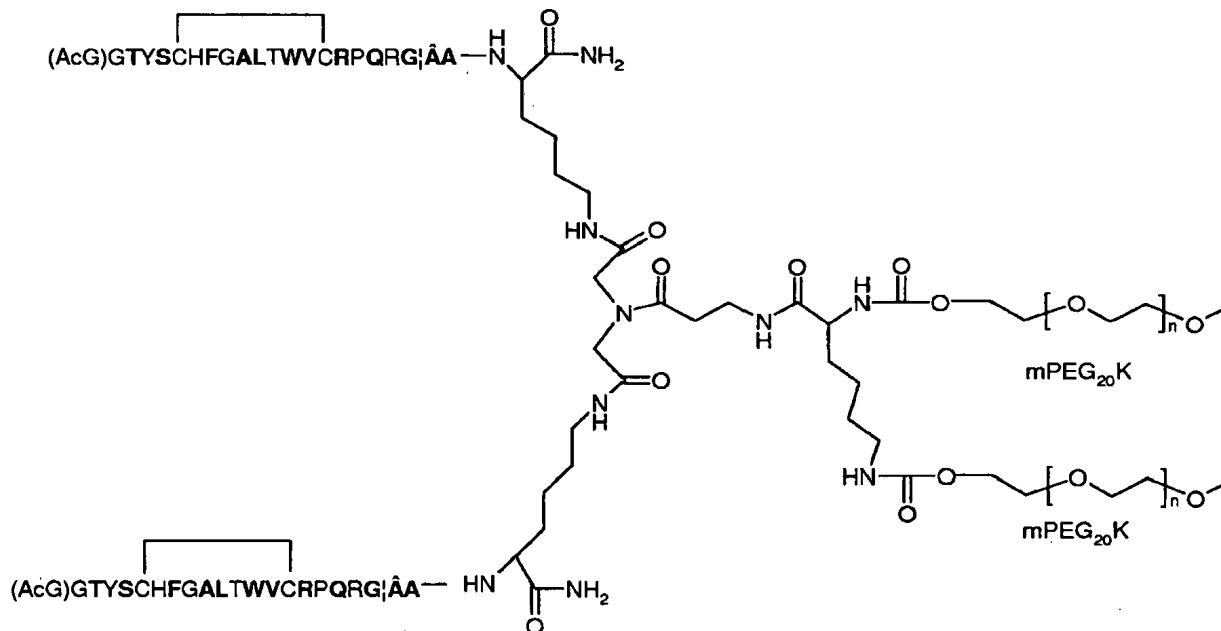
Ejemplo 14: Preparación de HH-EPO-018A



15 Disolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmoles) en 100 ml de N,N-dimetilformamida, añadir trietilamina 39,6 mg (0,196 mmoles), 3,8 g de mPEG₂-OSU(40K) (0,96 mmoles). Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Introducir la solución de reacción directamente en 600 ml de éter frío. El sólido precipita. Después de colocarlo en el frigorífico 2 horas, centrifugarlo y se obtiene HH-EPO-018 impuro mediante secado al vacío. El HH-EPO-018 se purifica mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y

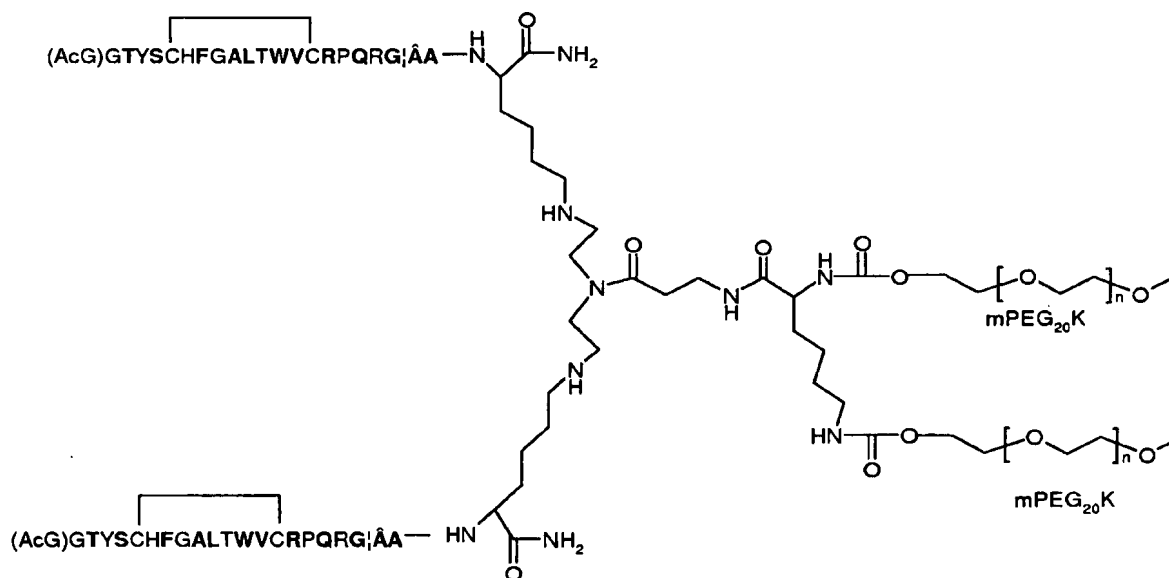
acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-018A: 1,5 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 39%).

Ejemplo 15: Preparación de HH-EPO-018B



Disolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmoles) en 100 ml de N,N-dimetilformamida, añadir trietilamina 39,6 mg (0,196 mmoles), 3,8 g de mPEG₂-OSU(40K) (0,96 mmoles). Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Introducir la solución de reacción directamente en 600 ml de éter frío. El sólido precipita. Después de colocarlo en el frigorífico 2 horas, centrifugarlo y se obtiene HH-EPO-018 impuro mediante secado al vacío. El HH-EPO-018 se purifica mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 μm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-018: 1,7 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 45%).

Ejemplo 16: Preparación de HH-EPO-018C



Disolver 0,5 g de HH-EPO-008 (0,98 mmoles) en 100 ml de N,N-dimetilformamida, añadir trietilamina 39,6 mg (0,196

mnoles), 3,8 g de mPEG₂-OSU(40K) (0,96 mmoles). Agitar la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Introducir la solución de reacción directamente en 600 ml de éter frío. El sólido precipita. Después de colocarlo en el frigorífico 2 horas, centrifugarlo y se obtiene HH-EPO-018 impuro mediante secado al vacío. El HH-EPO-018 se purifica mediante cromatografía de fase inversa, usando gel de sílice unido a octadecilsilano como relleno de la columna (Waters SymmetryShield™ RP18 3,5 µm, 4,6 x 100 mm), en la que la temperatura de la columna es 60°C y la longitud de onda de detección es 214 nm; se usan agua (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) y acetonitrilo (que contiene ácido trifluoroacético al 0,05%) en diferentes proporciones como fase móvil. Combinar y recoger las fracciones diana. Después de que la mayoría del acetonitrilo se ha eliminado por filtración a presión reducida, se prepara HH-EPO-018: 1,4 g mediante liofilización (el rendimiento es de aproximadamente el 37%).

10 Ejemplo 17: Efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre ratones

Propósito de este experimento

Evaluar y comparar los efectos de derivados peptidomiméticos de EPO y la proteína EPO sobre eritropoyesis de ratones.

Materiales y métodos:

15 Derivados peptidomiméticos de EPO que incluyen HH-EPO-001, HH-EPO-002, HH-EPO-003, HH-EPO-004, HH-EPO-005, HH-EPO-006, HH-EPO-007, HH-EPO-008, HH-EPO-015, HH-EPO-016, HH-EPO-017 y HH-EPO-018 son proporcionados por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical co., LTD. EPO se adquiere de Shenyang Sansheng Pharmaceutical Co., Ltd. Los ratones Kunming se adquieren de la Academia China de Ciencias Centro de Experimentación Animal de Shanghái, pesando 25 ~ 30g, ♀. El número de animales en cada grupo es 10.

20 A los ratones se les inyectó por vía subcutánea con derivados peptidomiméticos de EPO y proteína EPO durante tres días consecutivos. A continuación sacrificar los ratones, extraer sangre completa para llevar a cabo recuentos de células y reticulocitos de sangre periférica. El recuento de células sanguíneas se lleva a cabo usando recuentos en contador de células sanguíneas automático.

Resultados y análisis

25 De acuerdo con el régimen de dosificación actual, tanto derivados peptidomiméticos de EPO como la proteína EPO pueden promover significativamente que el recuento de reticulocitos en sangre periférica de ratón se incremente, indicando que estimulan la eritropoyesis (véase la tabla 1). Derivados peptidomiméticos de EPO y la proteína EPO no tienen ninguna influencia significativa sobre glóbulos rojos maduros, hematocrito de células sanguíneas, contenido de hemoglobina (véase la tabla 2), y tampoco tienen ninguna influencia significativa sobre el recuento de leucocitos en sangre periférica (Véase la tabla 3).

Tabla 1 Efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre eritropoyesis de reticulocitos de ratón.

Grupo	ratón (número)	Dosis y programas	recuento de reticulocitos ($\times 10^9/l, x \pm SD$)
control	10	BSA al 0,1% en NS	136,9 \pm 5,6
HH-EPO-005	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	947,2 \pm 14,7
HH-EPO-006	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	515,0 \pm 22,7
HH-EPO-007	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	553,5 \pm 26,6
HH-EPO-008	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	908,1 \pm 21,7
HH-EPO-015	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1146,9 \pm 176,6
HH-EPO-016	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1796,4 \pm 304,4
HH-EPO-017	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1208,9 \pm 178,5
HH-EPO-018	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	2000,6 \pm 272,0
HH-EPO-018A	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1889,3 \pm 252,0
HH-EPO-018B	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1969,7 \pm 312,0
HH-EPO-018C	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1879,3 \pm 162,0
EPO	10	5 µg/kg,sc,d1-3	483,9 \pm 146,5

Tabla 2 Efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre eritropoyesis de ratón, hematocrito de células sanguíneas, contenido de hemoglobina.

Grupo	ratón (número)	Dosis y programas	Recuento de glóbulos rojos ($\times 10^6/\mu\text{l}$, $x \pm \text{SD}$)	hematocrito de células sanguíneas (%)	hemoglobina (%)
control	10	0,1 %BSA in NS	9,6 \pm 0,5	48,2 \pm 3,0	14,8 \pm 0,7
HH-EPO-005	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	10,1 \pm 0,6	54,4 \pm 3,2	16,3 \pm 0,9
HH-EPO-006	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,6 \pm 0,5	50,5 \pm 2,8	15,3 \pm 0,9
HH-EPO-007	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,1 \pm 3,1	49,4 \pm 17,1	14,8 \pm 4,8
HH-EPO-008	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,6 \pm 0,2	54,0 \pm 1,7	16,1 \pm 0,5
HH-EPO-015	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	10,0 \pm 0,40	54,57 \pm 2,50	15,01 \pm 0,57
HH-EPO-016	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,88 \pm 0,42	56,50 \pm 2,95	13,24 \pm 4,2
HH-EPO-017	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,70 \pm 0,30	55,84 \pm 2,33	14,93 \pm 0,55
HH-EPO-018	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,69 \pm 0,33	56,97 \pm 3,13	13,22 \pm 2,66
HH-EPO-018A	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,44 \pm 0,65	54,47 \pm 2,61	14,35 \pm 1,35
HH-EPO-018B	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,77 \pm 0,51	55,71 \pm 3,31	13,72 \pm 2,35
HH-EPO-018C	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	9,59 \pm 0,53	54,98 \pm 2,83	13,86 \pm 2,47
EPO	10	5 μg /kg,sc,d1-3	9,0 \pm 0,6	46,2 \pm 2,7	14,3 \pm 0,7

Tabla 3 Efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre plaquetas de ratón, generación de leucocitos

Grupo	ratón (número)	Dosis y programas	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
control	10	BSA al 0,1% en NS	1078,0 \pm 151,2	5,1 \pm 1,5
HH-EPO-005	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1957,8 \pm 349,5	4,2 \pm 1,2
HH-EPO-006	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1087,8 \pm 118,5	4,1 \pm 1,2

HH-EPO-007	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	2082,1±863,9	3,6±0,8
HH-EPO-008	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1685,5±351,3	2,9±0,5
HH-EPO-015	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1106,6±170,03	4,32±1,29
HH-EPO-016	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1275,88±239,90	5,06±1,41
HH-EPO-017	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1109,60±130,73	4,25±1,65
HH-EPO-018	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1317,50±461,06	4,11±1,31
HH-EPO-018A	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1432,50±453,05	4,23±1,23
HH-EPO-018B	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1337,70±363,06	4,07±1,23
HH-EPO-018C	10	4,5 mg/kg,sc,d1-3	1355,50±331,07	4,21±1,34
EPO	10	5 µg/kg,sc,d1-3	1306,8±170,	4,0±0,9

Ejemplo 18: Efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre macacos

Propósito de este experimento:

Evaluar los efectos de derivados peptidomiméticos de EPO sobre la eritropoyesis de los macacos.

5 Materiales y métodos:

El derivado peptidomimético de EPO HH-EPO-018 es proporcionado por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical co., LTD. EPO se adquiere de Shenyang Sansheng Pharmaceutical Co., Ltd. Diluirla en solución salina que contiene BSA al 0,1% antes de usarlo.

10 Macacos, con un peso de 5,5~8,5 kg, machos o hembras, se adquieren de Suzhou Xishan Zhongke Laboratory Animal Center. Los macacos se agrupan de acuerdo con la base de hemoglobina con tres macacos en cada grupo. HH-EPO-018 1,35 mg/kg se inyecta por vía intravenosa una vez; EPO 240 µ/kg, tres veces/semana, administración continua durante cinco semanas. Medir los índices hematológicos 1~2 veces por semana.

Resultados y análisis

15 Una única inyección intravenosa de HH-EPO-018 en macacos causa un incremento del contenido de hemoglobina en sangre periférica, un incremento del hematocrito de células sanguíneas, lo que indica que HH-EPO-018 estimula la eritropoyesis. La estimulación alcanzaba un máximo a los 35 días después de la administración, y a continuación disminuía lentamente. El efecto estimulador de la hemoglobina es de aproximadamente el 33%. Como control positivo, la EPO también proporcionó el mismo incremento del contenido de hemoglobina en sangre periférica y el hematocrito de células sanguíneas de macacos, y su efecto declina lentamente después de dejar de administrar la medicina. De acuerdo con el régimen de dosificación actual, la estimulación de HH-EPO-018 y EPO sobre la
20 generación de hemoglobina de macaco es considerable (véase las figuras 1, 2).

Ejemplo 19: Evaluar y comparar los efectos de derivados peptidomiméticos de EPO HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B y control positivo AF37702 sobre los ratones.

Materiales y métodos:

25 HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B y AF37702 son proporcionados por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical co., LTD, en la que AF37702 es también un derivado peptidomimético de EPO, producido por Affymax (nombre comercial: Hematide). Preparar la muestra en solución que contiene BSA al 0,1% antes de usarla. Los ratones Kunming se adquieren de la Academia China de Ciencias Centro de Experimentación Animal de Shanghai, con un peso de 25 ~ 30g, ♀. El número de animales en cada grupo es 10. Después de la adaptación, a los animales se les inyectó por vía subcutánea con HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B, AF37702. Sacrificar los ratones el sexto
30 día después de la primera dosis, extraer la sangre completa para llevar a cabo recuento de células y de reticulocitos de sangre periférica. Los recuentos de células sanguíneas se realizan usando recuentos en el contador de células sanguíneas automático ADVIA.

Resultados y análisis

35 Una única inyección subcutánea de HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B, AF37702 todos elevan significativamente el porcentaje y los recuentos de reticulocitos de la sangre periférica de ratón; en los que los

efectos de HH-EPO-018B son relativamente fuertes; les seguían los efectos de HH-EPO-018, AF37702; los efectos de HH-EPO-015 son los más débiles; los efectos de HH-EPO-018 y AF37702 son aproximadamente iguales (véase la tabla 4). HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B y AF37702 elevan el hematocrito de células sanguíneas de sangre periférica de ratón, contenido de hemoglobina. Sus efectos son aproximadamente iguales, pero no tienen todos ninguna influencia significativa sobre el recuento de glóbulos rojos periféricos (Véase la tabla 5).

5

Tabla 4: Efectos de HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B y AF37702 sobre la eritropoyesis de reticulocitos de sangre periférica de ratón

Grupo	ratón (número)	Dosis y programas	eritropoyesis de reticulocitos (x±SD)	Recuento de eritropoyesis de reticulocitos (×10 ⁹ /l,x±SD)
control	10	BSA al 0,1 en NS	2,8±1,0	195,0±73,1
HH-EPO-015	10	2,5mg/kg,sc,d1	6,9±2,1**	511,9±191,7**
HH-EPO-015	10	5,0 mg/kg,sc,d1	8,9±2,4**	558,9±230,5**
HH-EPO-018	10	2,5mg/kg,sc,d1	16,2±3,5**	1137,3±240,2**
HH-EPO-018	10	5,0 mg/kg,sc,d1	16,0±3,2**	1113,2±210,7**
HH-EPO-018B	10	2,5mg/kg,sc,d1	19,0±8,9**	1336,5±629,0**
HH-EPO-018B	10	5,0 mg/kg,sc,d1	20,0±5,3**	1440,3±416,5**
AF37702	10	2,5mg/kg,sc,d1	13,5±4,1**	865,2±291,4**
AF37702	10	5,0mg/kg,sc,d1	17,2±5,3**	1202,8±355,4**
**P<0,01 frente a control				

Tabla 5: Efectos de HH-EPO-015, HH-EPO-018, HH-EPO-018B y AF37702 sobre eritropoyesis periférica de ratón, hematocrito de células sanguíneas, contenido de hemoglobina.

10

Grupo	ratón (número)	Dosis y programas	Recuento de glóbulos rojos (×10 ⁶ /μl,x±SD)	hematocrito de células sanguíneas (×10 ⁹ /l,x±SD)	hemoglobina (g/dl)
control	10	BSA al 0,1% en NS	6,9±0,5	38,6±2,8	12,5±0,9
HH-EPO-015	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,5±0,3	42,7±1,8*	14,3±0,6**
HH-EPO-015	10	5,0 mg/kg,sc,d1	6,3±1,7	36,5±9,9	13,1±4,5
HH-EPO-018	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,0±0,3	40,6±1,6	13,3±2,2
HH-EPO-018	10	5,0 mg/kg,sc,d1	7,0±0,3	41,5±1,2*	14,2±0,8**
HH-EPO-018B	10	2,5mg/kg,sc,d1	6,6±1,4	39,0±7,7	14,2±0,6**
HH-EPO-018B	10	5,0 mg/kg,sc,d1	7,0±0,4	41,6±2,6*	14,4±0,9**
AF37702	10	2,5mg/kg,sc,d1	7,1±0,4	41,9±3,1*	14,1±1,1**
AF37702	10	5,0mg/kg,sc,d1	7,2±0,3	42,5±3,4*	14,0±0,8**
*P<0,05, **P<0,01 frente a control					

Listas de secuencias

<110> Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Co., LTD.

<120> UN DERIVADO PEPTIDOMIMÉTICO DE ERITROPOYETINA Y SU SAL FARMACÉUTICA, LA PREPARACIÓN Y USOS DEL MISMO

<130> 78017CPCT

5 <150> CN200710198751.9

<151> 12-12-2007

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Acetilación

15 <222> (1)..(1)

<220>

<221> Amida

<222> (6)..(15)

<400> 1

Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp val Lys Gln
1 5 10 15

20 Pro Leu Arg Gly Gly Lys
20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> Acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> Amida

30 <222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa=orn

<400> 2

Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Xaa Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

<210> 3

<211> 22

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

10 <220>

<221> amida

<222> (6)..(15)

<400> 3

Gly Gly Leu Tyr Ala Lys His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

15 <210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> amida

<222> (6)..(15)

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa=Om

<400> 4

Gly Gly Leu Tyr Ala Xaa His Tyr Gly Pro Ile Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

10 <221> Disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

15 <223> Xaa=bAla

<400> 5

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 6

<211> 22

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

25 <220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7, 21)

<223> No. 7 Xaa = Nle; No. 21 Xaa = bAla

<400> 6

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys xaa Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

5 <210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 7

20 **Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ser Leu Thr Trp Val Cys Arg**
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

25 <213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

30 <221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

5 <400> 8

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys .
20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

15 <221> amida

<222> (6)..(15)

<400> 9

Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Lys Gln
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
20

<210> 10

20 <211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

25 <222> (1)..(1)

<220>

<221> amida

<222> (6)..(15)

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa=Om

<400> 10

Gly Gly Leu Tyr Ala Asp His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Xaa Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

5 <210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> amida

<222> (6)..(15)

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa=Om

<400> 11

Gly Gly Leu Tyr Ala Xaa His Tyr Gly Pro Met Thr Trp Val Asp Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys
 20

20 <210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> amida

30 <222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

5 <400> 12

Gly Gly Thr Tyr Ser Lys His Phe Gly Pro Met Thr Trp Val Asp Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1) .. (1)

<220>

15 <221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

20 <223> Xaa=bAla

<400> 13

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 14

<211> 22

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

30 <220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15, 21)

5 <223> No. 15 Xaa = Homocisteína; No. 21 Xaa = bAla

<400> 14

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Met Thr Trp Val Xaa Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 15

<211> 22

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

15 <220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (15, 21)

<223> No. 15 Xaa = Homocisteína; No. 21 Xaa = bAla

<400> 15

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Xaa Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 16

25 <211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

30 <222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (7, 15, 21)

<223> No. 7 Xaa = Nle; No. 15 Xaa = Homocisteina; No. 21 Xaa = bAla

<400> 16

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Xaa Phe Gly Pro Met Thr Trp Val Xaa Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

10 <210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7, 21)

<223> No. 7 Xaa = Nle; No. 21 Xaa = bAla

<400> 17

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Xaa Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

25 <210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

30 <220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 18

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

10

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

20 <222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

25 <400> 19

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ser Ile Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

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

<220>

<221> amida

<222> (6)..(15)

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 20

Gly Gly Thr Tyr Ser Lys His Phe Gly Ser Met Thr Trp Val Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Glu Arg Gly xaa Lys
 20

15 <210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

25 <400> 21

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Leu
 1 5 10 15

Pro Met Ala Gly Gly Lys
 20

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220> SEQ.txt

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

5 <221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<400> 22

Gly Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Leu
1 5 10 15

Pro Met Ala Gly Gly Lys
20

<210> 23

10 <211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

15 <222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 23

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Met Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

25 <210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <221> acetilación

<222> (1)..(1)
 <220>
 <221> disulfuro
 <222> (6)..(15)
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa=bAla
 <400> 24
 10 **Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Ala Ile Thr Trp Val Cys Arg**
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20
 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> acetilación
 <222> (1)..(1)
 <220>
 20 <221> disulfuro
 <222> (6)..(15)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 25 <223> Xaa=bAla
 <400> 25
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20
 <210> 26
 <211> 22
 30 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

<220>

5 <221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

10 <223> Xaa=bAla

<400> 26

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

<210> 27

<211> 22

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

20 <220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<400> 27

Gly Gly Met Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gly
1 5 10 15

Pro Ser Arg Gly Gly Lys
20

25 <210> 28

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1).. (1)

<220>

<221> disulfuro

5 <222> (6)..(15)

<400> 28

Gly Gly Met Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gly
 1 5 10 15

Pro Ser Arg Gly Gly Lys
 20

<210> 29

<211> 22

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

<222> (1)..(1)

15 <220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (21)..(21)

<223> Xaa=bAla

<400> 29

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Xaa Arg
 1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
 20

<210> 30

25 <211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> acetilación

30 <222> (1)..(1)

<220>

<221> disulfuro

<222> (6)..(15)

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (6, 21)

<223> No. 6 Xaa = Homocisteína; No. 21 Xaa = bAla

<400> 30

Gly Gly Thr Tyr Ser Xaa His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg
1 5 10 15

Pro Gln Arg Gly Xaa Lys
20

10

REIVINDICACIONES

1. Un derivado peptidomimético de eritropoyetina (EPO) de fórmula general (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables,

5 $R_1-R_2-(CH_2)_{n_1}-R_3-(CH_2)_{n_2}-R_4-R_5$ (I)

en la que R_1 , R_5 se seleccionan entre péptidos cíclicos que tiene las siguientes secuencias:

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:5)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-Nle-FGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:6)

Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:7)

Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:8)

Ac-GGTYSKHFGPMTWVDRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:12)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:13)

Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:14)

Ac-GGTYSCHFGPITWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:15)

Ac-GGTYSCHFGPMTWV-Hoc-RPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:16)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:17)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:18)

Ac-GGTYSCHFGSITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:19)

Ac-GGTYSKHFGSMTWVERPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:20)

Ac-GGTYSCHFGAMTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:23)

Ac-GGTYSCHFGAITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:24)

Ac-GGTYSCHFGPITWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:25)

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:26)

Ac-GGTYSCHFGPLTWV-Hoc-RPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:29)

Ac-GGTYS-Hoc-HFGPLTWVCRPQRG- β Ala- K-NH₂(SEC ID NO:30).

en las que n_1 , n_2 son números enteros seleccionados independientemente entre de 0 a 10;

en las que R_2 , R_4 se seleccionan entre -CO o -CH₂;

en las que R_3 se selecciona entre $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, o $\text{CHSCON}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$;

en las que n_4 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10,

en las que n_5 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10,

y en las que R_6 se selecciona entre H o derivados de metoxi-polietilenglicol.

5

2. El derivado peptidomimético de EPO de la reivindicación 1 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que la secuencia de aminoácidos de R_1 , R_5 podría ser uniforme o no uniforme.

10 3. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que los extremos N-terminales de R_1 , R_5 están acetilados.

4. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que R_1 , R_5 son péptidos cíclicos ciclados mediante puentes disulfuro.

15 5. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que R_1 , R_5 se seleccionan por separado entre péptidos cíclicos que tienen las siguientes secuencias:

Ac-GGTYSCHFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:5)

Ac-GGTYSCLNFGPLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:6)

Ac-GGTYSCHFGSLTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:7)

Ac-GGTYSCHFGALTWVCRPQRG- β Ala-K-NH₂(SEC ID NO:8)

20 6. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que dicho peptidomimético de EPO se selecciona entre el siguiente péptido, en el que

n_1 , n_2 son 2, R_2 , R_4 son -CO, R_3 es $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, n_5 es 2;

n_1 , n_2 son 1, R_2 , R_4 son -CO, R_3 es $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, n_4 es 2:

25 n_1 , n_2 son 2, R_2 , R_4 son -CH₂, R_3 es $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, n_5 es 2; o

n_1 , n_2 son 1, R_2 , R_4 son -CH₂, R_3 es $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, n_4 es 2.

7. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y sus sales farmacéuticamente aceptables, **caracterizado porque** R_6 es H.

30

8. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que R_6 es derivados de metoxi-polietilenglicol, y en el que el peso molecular de los derivados de metoxi-polietilenglicol se selecciona preferentemente entre 5.000 y 100.000 Dalton.

35 9. El derivado peptidomimético de EPO de la reivindicación 8 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el

que la estructura de los derivados de metoxi-polietilenglicol se selecciona entre el tipo ramificado o lineal, preferentemente los derivados de metoxi-polietilenglicol son de estructura lineal y tienen un peso molecular de 20.000 daltons, o los derivados de metoxi-polietilenglicol son de estructura lineal y tienen un peso molecular de 40.000 daltons.

5

10. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que

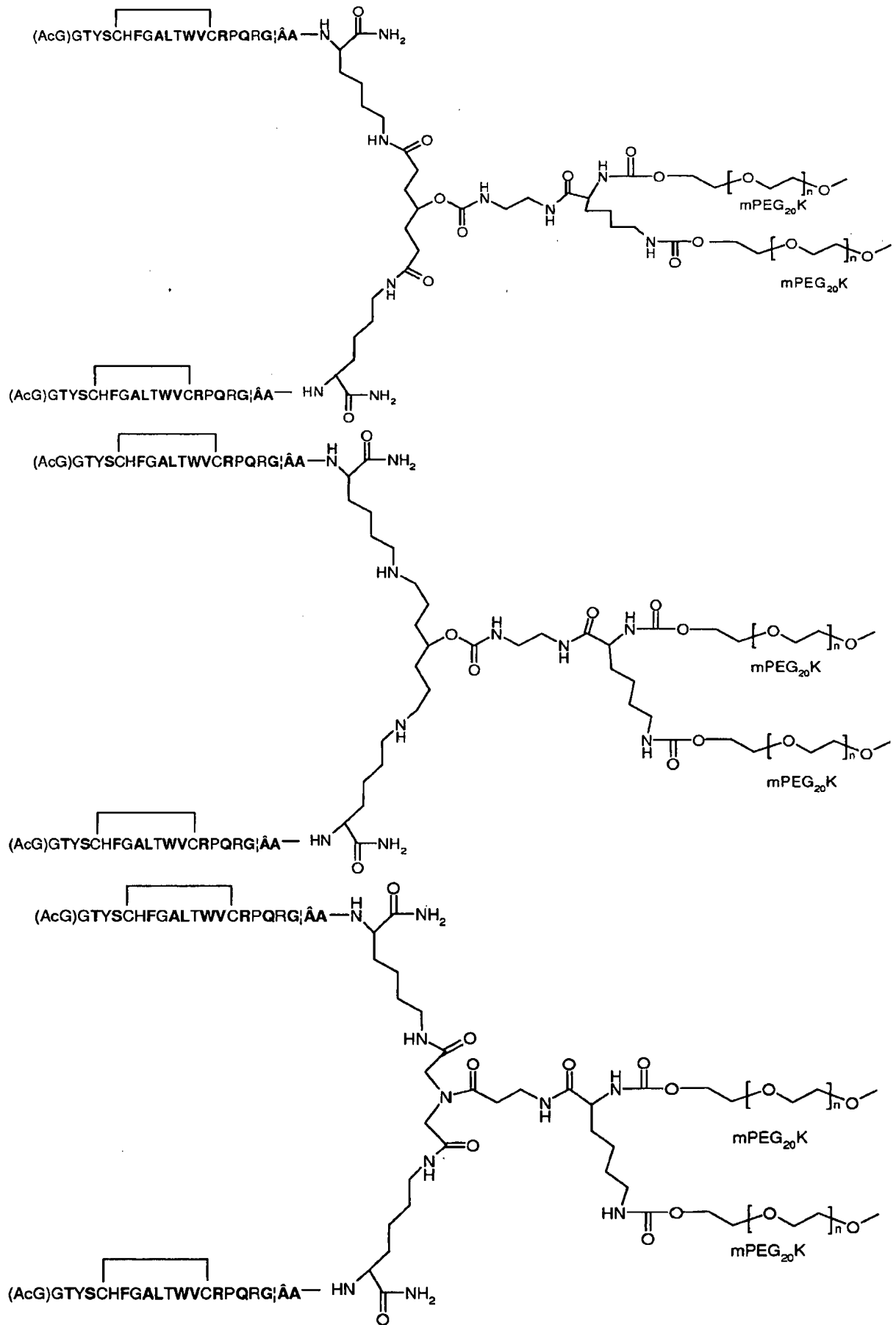
10 n_1, n_2 son 2, R_1, R_5 se seleccionan entre de la SEC ID N° 5 a la SEC ID N° 8, R_2, R_4 se seleccionan entre $-\text{CO}_2, -\text{CH}_2$, R_3 es $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, en el que n_5 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y peso molecular de 20.000 daltons;

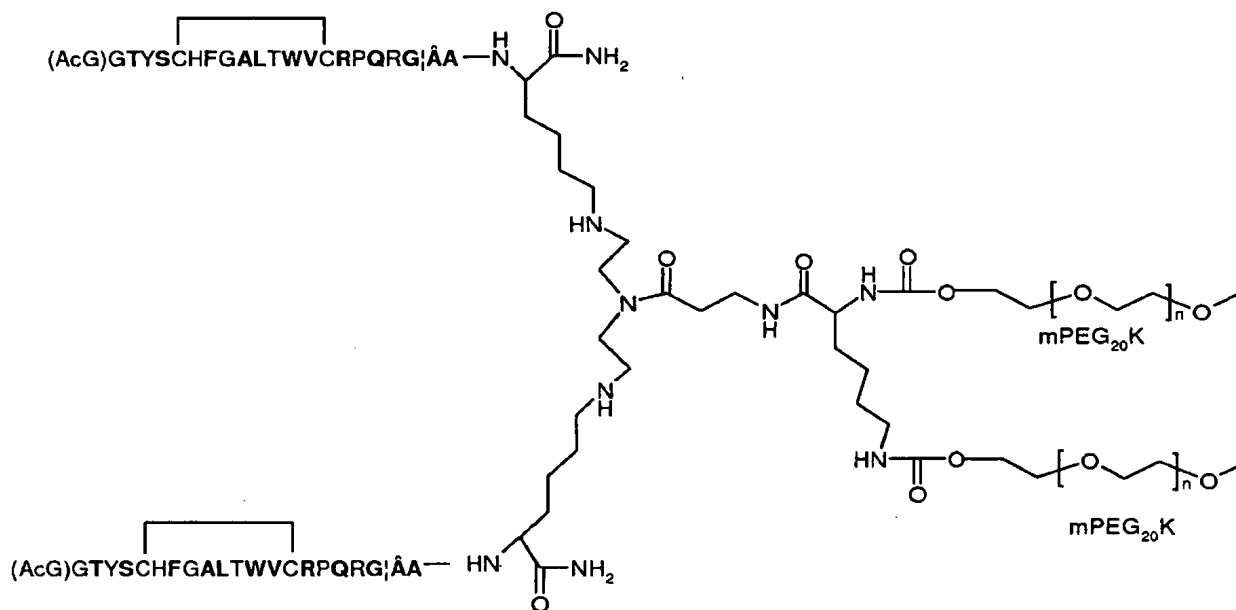
n_1, n_2 son 1, R_1, R_5 se seleccionan entre de la SEC ID N° 5 a la SEC ID N° 8, R_2, R_4 se seleccionan entre $-\text{CO}_2, -\text{CH}_2$, R_3 se selecciona entre $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, en el que n_4 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y peso molecular de 20.000 daltons;

15 n_1, n_2 son 2, R_1, R_5 se seleccionan entre de la SEC ID N° 5 a la SEC ID N° 8, R_2, R_4 se seleccionan entre $-\text{CO}_2, -\text{CH}_2$, R_3 es $\text{CHOCONH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{NHR}_6$, en el que n_5 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y peso molecular de 40.000 daltons; o

n_1, n_2 son 1, R_1, R_5 se seleccionan entre de la SEC ID N° 5 a la SEC ID N° 8, R_2, R_4 se seleccionan entre $-\text{CO}_2, -\text{CH}_2$, R_3 es $\text{NCO}(\text{CH}_2)_{n_4}\text{NHR}_6$, en el que n_4 es un número entero seleccionado entre de 2 a 10; R_6 es un derivado de metoxi-polietilenglicol con estructura lineal y peso molecular de 40.000 daltons.

20 11. El derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que dicho derivado peptidomimético de EPO y sus sales farmacéuticamente aceptables es

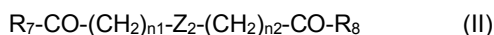




12. Un método para la preparación de un derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y sus sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que comprende:

5 (1) preparar R₁H, R₅H, en el que R₁, R₅ se seleccionan entre péptidos cíclicos que tienen las secuencias de la SEC ID N° 5-8, SEC ID N° 12-20, SEC ID N° 23-26, SEC ID N° 29-30;

(2) preparar una molécula pequeña funcional de fórmula general (II)

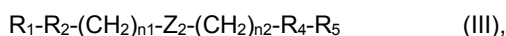


en la que n₁, n₂ son números enteros seleccionados independientemente entre de 0 a 10;

10 R₇, R₈ se seleccionan entre OH o H;

Z₂ se selecciona entre NCO(CH₂)_{n₇}NHR₉, CHOCONH(CH₂)_{n₈}NHR₉, o CHSCON(CH₂)_{n₈}NHR₉, en el que n₇ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, n₈ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, R₉ se selecciona entre Boc o Cbz;

15 (3) hacer reaccionar a R₁, R₅ con una molécula pequeña funcional de fórmula (II) a través de amidación o aminación reductora para preparar el compuesto de fórmula (III),



en el que R₂, R₄ se seleccionan independientemente entre -CO o -CH₂;

(4) después de que se elimina Boc o Cbz, llevar a cabo la reacción de amidación con metoxi-poli-etilenglicol activo.

20

13. El método para la preparación de la reivindicación 12, **caracterizado porque** en dicha fórmula general (II)

n₁, n₂ son 1 ó 2, R₇, R₈ son OH, Z₂ se selecciona entre NCO(CH₂)_{n₇}NHR₉ o CHOCONH(CH₂)_{n₈}NHR₉, n₇ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, n₈ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, R₉ es Boc; o

25 n₁, n₂ son 1 ó 2, R₇, R₈ son H, Z₂ se selecciona entre NCO(CH₂)_{n₇}NHR₉ o CHOCONH(CH₂)_{n₈}NHR₉, n₇ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, n₈ es un número entero seleccionado entre de 2 a 10, R₉ es Boc.

14. Una composición farmacéutica que comprende:

(1) una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y

(2) vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 15. Uso del derivado peptidomimético de EPO de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o sales farmacéuticamente aceptables del mismo o una composición farmacéutica de la reivindicación 14, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos **caracterizados por** un bajo nivel de EPO o un grupo de glóbulos rojos insuficiente o defectuoso.

10 16. El uso de la reivindicación 15, en el que dichos trastornos **caracterizados por** un bajo nivel de EPO o grupo de glóbulos rojos insuficiente o defectuoso son insuficiencia renal avanzada o diálisis; anemia relacionada con el SIDA, enfermedades autoinmunitarias, o tumor maligno; fibrosis quística; anemia temprana del prematuro; anemia relacionada con enfermedad inflamatoria crónica; lesión de la médula espinal; pérdida de sangre aguda; envejecimiento y cáncer con producción de glóbulos rojos anormales.

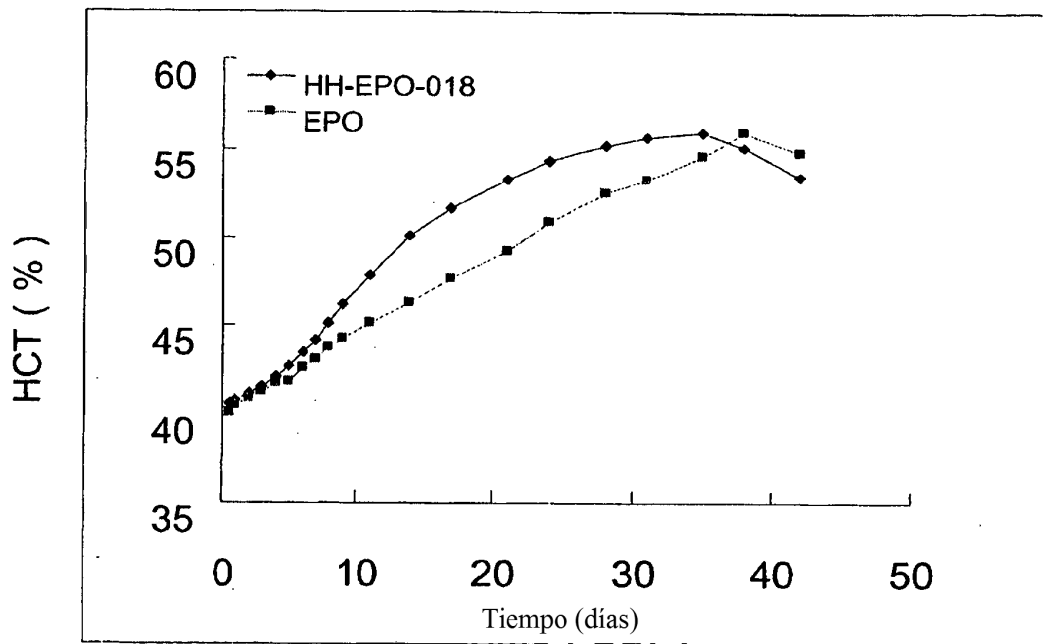


Figura 1

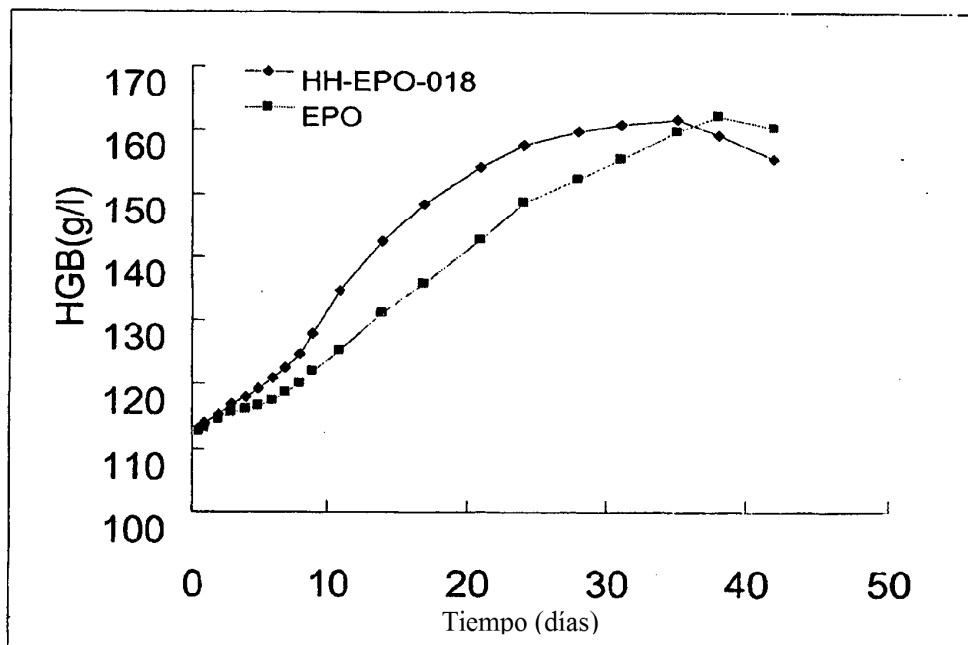


Figura 2