

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 337**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2012 E 12757055 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2683360**

54 Título: **Apelina pegilada y usos de la misma**

30 Prioridad:

11.03.2011 US 201161451623 P

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

07.06.2016

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**JIA, ZHIQIANG;
HOU, LIHUI;
PAN, CLARK Q. y
AKITA, GEOFFREY Y.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 573 337 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

Apelina pegilada y usos de la misma

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/451.623, presentada el 11 de marzo de 2011.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a composiciones para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la apelina. Específicamente, la invención se refiere a una forma pegilada de apelina para proporcionar vida en circulación y efectos inotrópicos prolongados, y así tratar eficazmente enfermedades o trastornos asociados a la apelina.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La apelina, un péptido inicialmente aislado de extractos de estómago bovino, actúa de ligando endógeno para el receptor APJ acoplado a la proteína G. El gen apelina codifica una pre-proteína de 77 aminoácidos, con un péptido señal en la región del extremo N. Después de la translocación en el retículo endoplásmico y escisión del péptido señal, la proproteína de 55 aminoácidos puede generar varios fragmentos activos: un péptido de 36 aminoácidos correspondiente a la secuencia 42-77 (apelina 36), un péptido de 17 aminoácidos correspondiente a la secuencia 61-77 (apelina 17) y un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a la secuencia 65-77 (apelina 13).

20 La apelina y su receptor se expresan en la mayoría de los tejidos y órganos, que incluyen el sistema cardiovascular. Se ha informado de múltiples efectos relevantes para el sistema cardiovascular, que incluyen actividades inotrópicas positivas, efecto diurético y protección miocárdica directa de lesión por isquemia-reperusión lesión. En cuanto a su efecto sobre la tensión arterial, los informes son opuestos. Algunos de los estudios mostraron una disminución de la tensión arterial mediante un mecanismo dependiente de NO, pero también hay resultado contradictorio informado con la apelina 13 de que aumenta la tensión arterial, además de un cambio bifásico de la tensión arterial media.

25 Varios estudios han documentado efectos cardiovasculares de la apelina, que incluyen inotropía y vasodilatación potenciadas. Sin embargo, estos efectos cardiovasculares son efímeros debido a la corta vida en circulación del péptido apelina.

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones de apelina mejoradas para mejorar su vida en circulación, efectos inotrópicos, y otras características beneficiosas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

30 La invención proporciona una apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de la apelina 36. La apelina pegilada tiene una vida en circulación y efecto inotrópico prolongados, con respecto a una apelina no pegilada.

35 Adicionalmente, la invención proporciona métodos de producción de la apelina pegilada haciendo reaccionar una apelina 36 con un conector activado de PEG-aldehído en presencia de un agente reductor para formar la apelina 36 pegilada en condiciones en las que el conector está covalentemente unido a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de dicha apelina.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la apelina 36 pegilada.

La invención proporciona además kits que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la apelina pegilada.

40 La invención proporciona además una cantidad terapéuticamente eficaz de la apelina 36 pegilada para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a una apelina, en un sujeto, en el que la enfermedad o trastorno es una enfermedad cardiovascular, una lesión por isquemia-reperusión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, trastorno endocrino, trastorno metabólico o hipertensión pulmonar.

45 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada de ejemplos y figuras. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. El perfil de la columna de cromatografía de intercambio catiónico débil de PEG-apelina-36 de 40 kDa.

50 Figura 2. La secuenciación del extremo N mostró PEGilación selectiva de apelina-36 en el extremo N. Para apelina-36, el primer residuo L, se detectó en el primer ciclo (el pico indicado por la flecha sólida en el panel superior). Sin

embargo, solo se obtuvo el 2 % de recuperación del primer residuo L del conjugado de PEG-apelina-36 de 40 kDa (flecha en el panel inferior).

Figura 3. Unión competitiva del radioligando al receptor APJ usando apelina, sus conjugados de PEG y α -MSH, un control negativo.

5 Figura 4. La unión de un grupo de PEG del extremo N a apelina-36 no compromete su función como agonista de APJ. En un ensayo de acumulación de AMPc mediada por forskolina, la CI50 de PEG-apelina-36 se desplazó 1,5 veces a la derecha, sin cambio en la inhibición máxima de la acumulación de AMPc mediada por forskolina frente a apelina-36 sin modificar.

10 Figura 5a. PEG-apelina-36 produjo efectos inotrópicos prolongados en ratas. En ratas normales que recibieron PEG-apelina-36 30 nM (Peg36Lo), la FE aumentó en comparación con el nivel inicial (BL) y solución salina normal (NS) en todos los momentos de tiempo. En animales que recibieron apelina-36 30 nM (Ap36Lo), la FE no fue significativamente diferente de BL y NS a los 50 min. * $p < 0,05$ frente a BL y NS cronometrada; IV= infusión intravenosa.

15 Figura 5b. En ratas normales que recibieron PEG-apelina-36 300 nM (Peg36Hi), la FE aumentó en comparación con el nivel inicial (BL) y la solución salina normal (NS) en todos los momentos de tiempo. En animales que recibieron apelina-36 300 nM (Ap36Hi), la FE no fue significativamente diferente de BL después de 50 min, y no fue significativamente de NS después de 60 min. * $P < 0,05$ frente a BL; ^ $P < 0,05$ frente a NS cronometrada; IV = infusión intravenosa.

20 Figura 6. PEG-apelina-36 produjo efectos inotrópicos prolongados en ratas con infarto de miocardio (IM). En ratas con IM que recibieron PEG-apelina-36 (Peg36MI), la FE aumentó en comparación con el nivel inicial (BL) y la solución salina normal (NSMI) en todos los momentos de tiempo. En ratas con IM que recibieron apelina 36 (Ap36MI), la FE no fue significativamente diferente de BL después de 50 min y no fue significativamente diferente de NSMI después de 60 min. * $P < 0,05$ frente a BL; ^ $P < 0,05$ frente a NSMI cronometrada; IV = infusión intravenosa.

25 Figura 7. Inyección IV de PEG-apelina-36 (Peg36) o apelina-36 (Ap36) en ratas normales; y apelina 36 en ratas con IM (Ap36MI) no produjeron cambios en la tensión arterial aórtica media (TAA media).

Figura 8. PEG-apelina-36 (Peg36) tiene una vida en circulación más larga que la apelina-36 (Ap36). En el grupo de Peg36, la apelina-36 en sangre aumentó en comparación con el nivel inicial en todos los momentos de tiempo. * $p < 0,05$ frente al nivel inicial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La invención se refiere a composiciones para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la apelina. Específicamente, la invención se refiere a una forma pegilada de apelina 36 para proporcionar vida en circulación y efectos inotrópicos prolongados, y así tratar eficazmente enfermedades o trastornos asociados a la apelina.

35 En una realización, en el presente documento se proporciona una molécula de apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de la apelina 36.

En otra realización, en el presente documento se proporciona un método de producción de una apelina 36 pegilada, que comprende la etapa de: hacer reaccionar una apelina 36 con un conector activado de PEG-aldehído en presencia de un agente reductor para formar dicha apelina 36 pegilada en condiciones en las que el conector está covalentemente unido a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de dicha apelina 36.

40 En otra realización, en el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de la apelina 36.

45 En otra realización, en el presente documento se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de dicha apelina 36 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a una apelina en un sujeto, en la que la enfermedad o trastorno es una enfermedad cardiovascular, una lesión por isquemia-reperusión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, trastorno endocrino, trastorno metabólico o hipertensión pulmonar.

50 Para tratar las limitaciones en las características del péptido apelina, se produjo satisfactoriamente una apelina pegilada de 40 KDa, se caracterizó y se evaluó *in vitro* e *in vivo*. Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendente e inesperadamente que, en comparación con la apelina, la apelina pegilada presentaba una vida en circulación prolongada y, correspondientemente, un efecto inotrópico prolongado tras la administración IV.

La apelina es una proteína muy conocida. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la apelina son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los números de identificación de GenBank AAF25815.1 y AF179680 contienen las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la apelina, respectivamente.

En una realización, la apelina comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

5 En otra realización, la apelina está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 2.

El término apelina 36, como se usa en el presente documento, se refiere al péptido de 36 aminoácidos de los residuos de aminoácidos 42-77 de SEQ ID NO: 1.

10 La una o más moléculas de PEG pueden ligarse operativamente a un péptido apelina mediante cualquier método de enlace conocido. Por ejemplo, dos o más moléculas de PEG pueden ligarse operativamente mediante un simple enlace covalente, un conector peptídico flexible o un puente de disulfuro. Los conectores peptídicos pueden ser completamente artificiales (por ejemplo, que comprenden 2 a 20 residuos de aminoácidos independientemente seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina) o adoptados de proteínas que existen de forma natural.

15 En una realización, un péptido apelina se hace reaccionar con un conector activado de PEG-aldehído en presencia de un agente reductor (por ejemplo, cianoborohidruro) para formar una apelina pegilada en condiciones en las que el conector está covalentemente unido a un residuo de aminoácido (por ejemplo, leucina) en el extremo N de la apelina.

20 La PEGilación de las moléculas puede llevarse a cabo, por ejemplo, según los métodos descritos en Youngster et al., *Curr Pharm Des* (2002), 8:2139; Grace et al., *J Interferon Cytokine Res* (2001), 21:1103; Pepinsky et al., *J Pharmacol Exp Ther* (2001), 297:1059; Pettit et al., *J Biol Chem* (1997), 272:2312; Goodson et al. *Biotechnology NY* (1990), 8:343; Katre; *J Immunol* (1990), 144:209.

25 Cualquier tipo de polietilenglicol es adecuado para la presente invención, a condición de que el PEG-polipéptido sea todavía funcionalmente activo, que puede ensayarse según métodos conocidos en la técnica. Preferentemente, el polietilenglicol de la presente invención es PEG 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, 15000, 20000, 30000 o 40000, siendo particularmente preferido PEG 30000 o 40000.

En un ejemplo, la molécula pegilada comprende una apelina monomérica. En otro ejemplo, la molécula pegilada comprende una apelina oligomérica. En otro ejemplo más, la molécula pegilada comprende un PEG de múltiples brazos, en el que una o más apelinas monoméricas están operativamente ligadas al PEG de múltiples brazos.

30 La apelina de la presente invención según una realización de la invención se produce recombinantemente usando un polinucleótido que codifica la apelina y vectores, preferentemente vectores de expresión que contienen dichos polinucleótidos. Para la producción de los oligómeros de la invención, los polinucleótidos se obtienen a partir de clones existentes, es decir, preferentemente codifican el polipéptido que existe de forma natural o una parte del mismo. Los polipéptidos codificados por cualquier polinucleótido que se hibrida con el complemento del ADN o ARN nativo bajo condiciones altamente rigurosas o rigurosas moderadas (para definiciones véase Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.), en tanto que el polipéptido mantenga la actividad biológica de la secuencia nativa, también son útiles para producir los oligómeros de la presente invención.

35 Los péptidos apelina también pueden prepararse por síntesis en fase sólida según métodos muy conocidos para un experto en la materia, véase, por ejemplo, Coligan (ed) et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc., (2001) N.J. Por ejemplo, los péptidos apelina-13 y apelina-36 se preparan por síntesis en fase sólida usando un estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos 430A (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un 9050 Pepsynthesizer Plus (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA). Los péptidos en bruto se purifican por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa preparativa. Las fracciones que contienen el péptido apropiado se reúnen y se liofilizan. La pureza del producto final se evalúa por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa analítica, electroforesis capilar y espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz.

40 Los vectores recombinantes pueden construirse según métodos muy conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. Puede utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión/huésped para contener y expresar secuencias que codifican los oligómeros de la presente invención.

45 Vectores a modo de ejemplo incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, virus y ácidos nucleicos de fago u otras moléculas de ácidos nucleicos que son capaces de replicación en un huésped procarionota o eucariota. Los vectores normalmente contienen un marcador para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de huéspedes transformados tales como conferir resistencia a antibióticos tales como ampicilina o neomicina

55 El vector puede ser un vector de expresión, en el que el ácido nucleico que codifica el péptido está operativamente ligado a una secuencia de control de la expresión. Vectores de expresión típicos contienen terminadores de la

transcripción y de la traducción, secuencias de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Los vectores también pueden contener casetes de expresión genética que contienen una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del vector en tanto eucariotas como procariotas, es decir, vectores lanzadera y marcadores de selección para sistemas tanto 5 procariotas como eucariotas.

Promotores adecuados incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. Secuencias de control de la expresión/promotores representativos incluyen el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, regiones operadoras y promotoras importantes del fago lambda, la región de control de la proteína de la envoltura *fd*, los 10 promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo, un promotor para 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la ácido fosfatasa de levadura, por ejemplo, *Pho5*, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, promotores derivados del citomegalovirus humano, promotor de la metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de la polihedrina y promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40.

La invención también incluye huéspedes no humanos tales como células u organismos que contienen una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención. Por "huésped" se indica un organismo unicelular o multicelular no humano o una "célula huésped", que se refiere a una célula o población de células en la que se introduce una molécula de ácido nucleico o vector de la invención. "Una población de células huésped" se refiere a un grupo de células cultivadas en el que una molécula de ácido nucleico o vector de la presente invención puede introducirse y expresarse.

Un huésped de la presente invención puede ser procariota o eucariota. Huéspedes procariotas adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*. Células eucariotas adecuadas incluyen levadura y otros hongos, células de insecto, células vegetales, células humanas y células de animales, que incluyen células de mamífero, tales como líneas de hibridoma, células COS, células NS0 y células CHO.

La invención también incluye métodos de producción de una apelina, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped; y recuperar la apelina de dicha célula huésped.

Dependiendo del sistema de expresión y el huésped seleccionado, las moléculas se producen cultivando células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente por el cual la proteína se expresa. La proteína expresada se aísla entonces de las células huésped y se purifica. Si el sistema de expresión secreta la proteína en medio de crecimiento, el producto puede purificarse directamente del medio. Si no se secreta, puede aislarse de lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y los métodos de recuperación están dentro de la experiencia de la materia. Por ejemplo, una vez expresado, el producto puede aislarse y purificarse por cualquier número de técnicas, muy conocidas en la técnica. Una proteína (por ejemplo, apelina) de la presente invención obtenida como antes puede aislarse del interior o exterior (por ejemplo, medio) de las células o huéspedes, y purificarse como una proteína homogénea sustancialmente pura. El método para el aislamiento y la purificación de proteínas no se limita a ningún método específico. En realidad, puede usarse cualquier método convencional. Por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación de sales, precipitación de disolventes, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en el punto isoelectrico, diálisis, y recristalización, pueden seleccionarse 40 apropiadamente y combinarse para aislar y purificar la proteína.

Para la cromatografía, por ejemplo, pueden usarse cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, y tales, (ed. Daniel R. Marshak et al. (1996) *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas cromatografías pueden realizarse por cromatografía de líquidos, tales como, HPLC y FPLC. Así, la presente invención proporciona proteínas altamente purificadas producidas por los métodos anteriores.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligómero, ácido nucleico, vector, o célula huésped de la presente invención, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier excipiente que es no tóxico para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica puede incluir un agente terapéutico o agentes terapéuticos adicionales.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, tampones, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes humectantes, conservantes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua; solución salina; solución salina tamponada con fosfato; dextrosa; glicerol; alcoholes tales como etanol e isopropanol; fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos

tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; EDTA; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS; agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, y cloruro sódico; además de combinaciones de los mismos. Agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. En algunas realizaciones, las composiciones están en forma de disoluciones inyectables o infusibles. La composición está en una forma adecuada para administración oral, intravenosa, intrarterial, intramuscular, subcutánea, parenteral, transmucosa, transdérmica o tópica. La composición puede formularse como una composición de liberación inmediata, controlada, prolongada o retardada.

Preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. En el objeto de la invención, vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05M o 0,8 % de solución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones (si son soluble en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. Formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16th ed. (1980).

En algunas realizaciones, la composición incluye agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando la molécula, por sí misma o en combinación con otros agentes activos, en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, un método de preparación es secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se cierran bajo condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y comercializarse en forma de un kit tal como aquellos descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. N.º 2002/0102208 A1. Tales artículos de fabricación tendrán preferentemente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o predispuesto a trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de afecciones o enfermedades como se describen en el presente documento, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento pueden valorarse usando métodos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz". Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula

puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la molécula para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la molécula se sopesa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

5 La invención proporciona además una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de apelina 36 pegilada para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a una apelina, en la que la enfermedad o afección es una enfermedad cardiovascular, una lesión por isquemia-reperfusión, un infarto de miocardio, una insuficiencia cardíaca aguda descompensada, una insuficiencia cardíaca crónica, una cardiomiopatía, un trastorno endocrino/metabólico o hipertensión pulmonar.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a tratamiento terapéutico, que incluye medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico no deseado asociado a una enfermedad o afección. Resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución del grado de una enfermedad o afección, estabilización de una enfermedad o afección (es decir, en la que la enfermedad o afección no empeora), retraso o
15 ralentización de la progresión de una enfermedad o afección, mejora o paliación de la enfermedad o afección, y remisión (tanto parcial como total) de la enfermedad o afección, tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la enfermedad o afección, además de aquellos propensos a tener la enfermedad o afección, o aquellos en los que la enfermedad o afección va a
20 prevenirse.

La apelina pegilada puede administrarse sola, o en combinación con uno o más agentes o tratamientos terapéuticamente eficaces. El otro agente terapéuticamente eficaz puede conjugarse con la apelina pegilada, incorporarse en la misma composición que la apelina pegilada, o puede administrarse como una composición separada. El otro agente o tratamiento terapéutico puede administrarse antes de, durante y/o después de la
25 administración de la apelina pegilada.

La administración de la apelina pegilada con otros agentes y/o tratamientos puede producirse simultáneamente, o por separado, mediante la misma vía o diferente, en el mismo momento o momentos diferentes. Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

30 En un ejemplo, puede administrarse un único bolo o infusión. En otro ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo. En otro ejemplo más, una dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para tratar sujetos mamíferos. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir
35 un efecto terapéutico deseado. En algunas realizaciones, las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que va a lograrse.

La composición de la invención puede administrarse solo una vez, o puede administrarse múltiples veces. Para dosificaciones múltiples, la composición puede administrarse, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, o mensualmente.

40 Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que va a aliviarse. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto particular, pautas de dosificación específicas deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o
45 que supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo solo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

"Administración" a un sujeto no se limita a ningún sistema de administración particular y puede incluir, sin limitación, parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intrarticular, intramuscular o intraperitoneal),
50 rectal, tópica, transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos). La administración a un huésped puede producirse en una dosis única o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de formas de sal fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica (descrita anteriormente). De nuevo, formas de sal fisiológicamente aceptables y técnicas de formulación farmacéutica convencionales son muy conocidas para expertos en la materia (véase, por ejemplo,
55 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.).

La composición de la invención (es decir, apelina 36 pegilada) puede administrarse parenteralmente (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Además, la composición de la invención puede administrarse por infusión o inyección intravenosa. La composición de la invención puede administrarse por

inyección intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse por vía oral. Como se usa en el presente documento, una "composición" se refiere a cualquier composición que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz de una apelina pegilada.

- 5 El tratamiento descrito en el presente documento puede usarse para tratar cualquier mamífero adecuado, que incluye primates, tales como monos y seres humanos, caballos, vacas, gatos, perros, conejos, y roedores tales como ratas y ratones. En una realización, el mamífero que va a tratarse es el ser humano.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

EJEMPLOS

10 **EJEMPLO 1**

Apelina 36 conjugada con PEG

- Se produjo satisfactoriamente una apelina-36 conjugada con PEG de 40 kDa (PEG-apelina-36) con conjugación del extremo N, alta pureza (>98 %) y mínima reducción de la afinidad de unión del receptor APJ Usando un ensayo de inhibición de adenilato ciclasas, se observó bioactividad *in vitro* comparable entre PEG-apelina-36 y apelina-36 no modificada. La evaluación *in vivo* de PEG-apelina-36 se realizó en ratas normales y ratas con infarto de miocardio (IM). Se evaluó la función cardíaca mediante ecocardiografía antes, durante una infusión IV de 20 minutos y hasta 15 100 minutos después de la infusión del péptido. Se observaron aumentos similares en la fracción de eyección (FE) cardíaca durante la infusión de PEG-apelina-36 y apelina-36 en ratas normales. Sin embargo, los animales que recibieron PEG-apelina-36 mantuvieron la FE significativamente elevada durante el periodo de monitorización después de la infusión de 100 minutos en comparación con los animales que recibieron apelina-36 no modificada. De forma interesante, los aumentos de la FE observados con PEG-apelina-36 y apelina-36 fueron mayores en ratas con IM. PEG-apelina-36 tuvo una vida en circulación prolongada en comparación con la apelina-36 en ratas. No hubo cambios en la tensión arterial aórtica cuando se administró PEG-apelina-36 o apelina-36.

EJEMPLO 2

25 **Materiales y métodos:**

PEGilación de apelina

- Conjugación de apelina-36 (AnaSpec, Fremont, CA):* La conjugación con aldehído-PEG ramificados de 10 kDa, 30 kDa y 40 kDa (NOF America Corp., White Plains, NY) se llevó a cabo a péptido 0,2 uM y PEG 0,4 uM en presencia de cianoborohidruro 20 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5. La conjugación se realizó a 25 °C durante la noche y se extinguió con Tris 2 mM a pH 7,5. Los conjugados se dializaron contra agua para eliminar el péptido no conjugado. El conjugado de apelina-36 PEGilado de 40 kDa (PEG-apelina-36) se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio catiónico débil en una columna HiTrap SP FF (G.E. Healthcare, Piscataway, NJ) para eliminar el PEG libre. El conjugado se eluyó a concentración 1,5 M de sales de la serie de columna de 15 minutos. Se usó Nanodrop A280 para determinar la concentración del conjugado de apelina-36.

- 35 *Determinación del sitio de PEGilación:* Se secuenciaron en el extremo N 200 pmoles de apelina-36 y PEG-apelina-36 en el secuenciador Procise (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el método de líquido pulsado pre-programado durante 18 ciclos. Se analizaron apelina-36 y PEG-apelina-36 también por espectrómetro de masas de MALDI-TOF (Voyager-DE PRO) (Applied Biosystems, Foster City, CA) en modo lineal usando DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) como matriz. El voltaje de aceleración fue 25.000 V.

- 40 *Ensayo de unión al receptor APJ:* La unión se realizó usando competición con sonda de [Glp⁶⁵, Nle⁷⁵, Tyr⁷⁷]-apelina 13 marcada con ¹²⁵I para unirse al receptor APJ en una fracción de membrana de las células CHO transfectadas (Perkin Elmer, Waltham, MA). El péptido diluido en serie se incubó con membrana y sonda durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se filtró entonces sobre una placa de filtración de fibra de vidrio tipo C de 1,2 um (Millipore Corp., Billerica, MA), bloqueada previamente con 0,5 % de polietilenimina. La placa se lavó 4 veces con 200 ul de tampón de unión helado y luego otras 4 veces con Tris-HCl helado 50 mM, pH 7,4, se secó y se contó con fluido de centelleo. Los datos se analizaron con Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA) usando regresión no lineal.

Ensayo de bioactividad *in vitro*

- 50 *Generación de un clon celular con expresión del receptor APJ de alto nivel:* Se mantuvieron células HEK293 (ATCC, Manassas, VA) a 37 °C / 5 % de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina y 10 % de suero bovino fetal (FBS). El plásmido pCMV6-XL4 (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD) que contenía un ADNc que codifica APJ humano se subclonó en pCMV6-Neo (Origene Technologies, Inc.) para generar pCMV6-APJ. Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con pCMV6-APJ usando Superfect (Qiagen Technologies Inc., Valencia, CA), y se seleccionaron en medio de selección

G418 (1 mg/ml). Se aislaron líneas celulares clonales usando discos de filtro estéril. La expresión superficial de APJ se detectó por citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal para APJ (MAB856, R&D Systems, Mineápolis, MN). Se usó un clon que expresa un alto nivel de APJ sobre la superficie celular (HEK293-APJ#3) para determinar la bio-actividad de los péptidos apelina.

- 5 *Medición de AMPc intracelular:* Se usaron células HEK293-APJ#3 para evaluar la actividad de los péptidos apelina y los péptidos derivados de apelina pegilada. Las células HEK293-APJ#3 se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células por pocillo. Al día siguiente, las células se pre-trataron a 37 °C durante 5 minutos con tampón de ensayo (IBMX 0,5 mM en DMEM que contiene penicilina/estreptomina y 0,5 % (peso/volumen) de BSA) antes de la adición de péptidos apelina (0-300 nM) y forskolina (30 µM) preparada en tampón de ensayo. Después de 15 minutos de incubación a 37 °C, se terminó la estimulación de apelina / forskolina por aspiración de los componentes del ensayo y adición de tampón de lisis 1B del kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de AMPc (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los lisados (5-50 µl) se ensayaron para AMPc según las instrucciones del kit de EIA. Se representaron los datos de AMPc intracelular (inhibición estimulada por apelina de la producción de AMPc mediada por forskolina) usando GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) y ajuste a una curva sigmoide de dosis-respuesta con pendiente variable.

Evaluación *in vivo*

- 20 *Efecto sobre la función cardíaca en ratas normales:* Se anestesiaron ratas Lewis hembra, que pesaban 225-250 g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con isoflurano (2,5 %), conducido por oxígeno (2,5 l/min) a través de un cono nasal. La temperatura corporal se mantuvo a 36 °C con una almohadilla calefactora del baño de agua y se complementó con una lámpara de calentamiento controlada por una sonda rectal conectada a un controlador de temperatura TCAT-20F (Physitemp Instruments, Inc., Clifton, NJ). La vena de la cola se canuló con un catéter IV Surflo de 24G. Entonces, los animales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos (n=7/grp) que recibieron o bien apelina-36 300 nM (Ap36Hi), apelina-36 30 nM (Ap36Lo), PEG-apelina-36 300 nM (Peg36Hi), PEG-apelina-36 30 nM (Peg36Lo), o bien solución salina normal (NS) intravenosamente a una dosis de 1 ml/20 min/250 g durante 20 minutos. Antes de la infusión, y a 10, 20 (final de la infusión IV), 30, 40, 50, 60 y 120 minutos después del inicio de la infusión IV, se obtuvieron imágenes de ecocardiografía de vista 2D del eje largo usando una sonda de 15 MHz y unidad de ecocardiografía GE Vivid 7 Dimension (GE Healthcare Technologies, Waukesha, WI). La anestesia se detuvo entre los momentos de tiempo de 60 y 120 minutos.

- 30 *Efecto sobre la función cardíaca en ratas con infarto de miocardio (IM):* Se creó un IM por la ligadura permanente de la arteria descendente anterior (LAD) izquierda en ratas Lewis macho de 250-275 g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Brevemente, el animal se anestesió por inyección IP de una mezcla de ketamina (40-80 mg/kg), xilazina (5-10 mg/kg) y diazepam (2-4 mg/kg) y la temperatura corporal se mantuvo como se ha descrito en la sección [0080]. Se insertó un catéter de 18G en la tráquea y el animal se ventiló usando un respirador para roedores (Modelo 683, Harvard Apparatus, Holliston, MA). El corazón se expuso mediante una incisión de toracotomía izquierda en el 4° o 5° espacio intercostal. La LAD se ligó usando una seda 6-0 a un nivel 1 a 2 mm distal al borde de la aurícula izquierda. Se cerró el torso en capas, y se dejó que el animal se recuperara en una estufa de incubación de temperatura controlada. Cincuenta y dos semanas después del IM, los animales se asignaron aleatoriamente para recibir apelina-36 30 nM (Ap36MI; n=5), PEG-apelina-36 30 nM (Peg36MI; n=5), o solución salina normal (NSMI; n=5) por infusión IV. La anestesia, el control de la temperatura y el protocolo experimental fueron los mismos que se han descrito en la Sección 2.3.1, excepto que se emplearon mayores niveles de flujo de isoflurano (3 % o hasta el efecto) y oxígeno (3 l/min) ya que el peso corporal de los animales estuvo entre 600 y 650 g.

- 45 *Efecto sobre la tensión arterial en ratas normales y con infarto de miocardio (IM):* Se anestesiaron ratas Sprague Dawley adultas macho normales que pesaban 360±14 g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) y la temperatura corporal se mantuvo como se ha descrito en el párrafo [0088]. Se expusieron quirúrgicamente la arteria carótida izquierda y la vena yugular. La arteria carótida izquierda se canuló con un catéter Millar Mikro-tip (Millar Instruments, Houston, TX) para la monitorizar la tensión arterial y la vena yugular izquierda se canuló con tubo PE-50 para inyección IV. La punta del catéter Millar se colocó en la aorta descendente y el extremo del catéter se conectó a un ordenador con un sistema de requerimiento de datos Powerlab (ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO) para monitorizar la tensión arterial. Entonces, los animales se asignaron aleatoriamente a 2 grupos (n=5/grupo) para recibir tanto PEG-apelina-36 como apelina-36 (disolución 300 nM, 0,4 ml/kg, bolo IV). En todos los animales se inyectó primero NS (0,4 ml/kg, bolo IV), seguido de inyección IV de los péptidos. Para inyecciones de NS, la tensión arterial se monitorizó antes (nivel inicial), y 10, 20, 40, 60, 180 y 300 segundos tras la inyección de NS. Al final de este periodo la tensión arterial volvió al nivel inicial y entonces se inyectó el péptido. La tensión arterial se monitorizó antes (nivel inicial), 10, 20, 40, 60, 180 y 300 segundos, y 10 y 20 minutos tras la inyección del péptido. Los datos de tensión arterial se analizaron usando el software Chart 5 Pro (ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO). Para la evaluación de la tensión arterial en ratas con IM, se realizó infarto de miocardio, como se ha descrito en el párrafo [0079], en 9 ratas Lewis adultas macho (329±16 g; Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Cuatro semanas después se evaluaron los efectos sobre la tensión arterial de apelina-36. El protocolo para la evaluación de la tensión arterial fue como se ha descrito anteriormente para animales normales.

60

Niveles en sangre de apelina

- Administración de los péptidos y extracción de sangre:* Se anestesiaron ratas Lewis hembra normales, que pesaban 225-250 g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), con temperatura corporal monitorizada y vena de la cola canulada como se ha descrito en la Sección 2.3.1. Además, la arteria carótida izquierda se canuló con tubo PE-50. Entonces, los animales se asignaron aleatoriamente para recibir o bien apelina-36 30 nM (n=5) o bien PEG-apelina-36 30 nM (n=5) intravenosamente a una dosis de 1 ml/20 min/250 g durante 20 minutos. Antes, durante (10 y 20 min) y 40 min después del inicio de la infusión IV, se recogieron 600 µl de sangre completa mediante la cánula de la arteria carótida usando un tubo recubierto de EDTA con aprotinina (0,6 UIT/ml de sangre; Phoenix Pharmaceutical Inc., Burlingame, CA) añadida. Después de la extracción de sangre en el momento de tiempo 40 minutos, se extrajo el tubo PE-50, se ligó la arteria carótida y se cerró la incisión. El animal se devolvió a su jaula para recuperarse de la anestesia. La extracción de sangre de 120 minutos se realizó por punción directa del corazón después de sacrificarse el animal con 1 ml de Euthasol (Virbac AH, Inc., Fort Worth, TX) IP y abrirse el torso. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1.600 x g durante 15 minutos a 4 °C. Entonces, el plasma se recogió y se mantuvo a -80 °C para el futuro análisis.
- Concentración de apelina 36 en plasma:* La concentración de apelina-36 en plasma se analizó usando un kit de inmunoensayo enzimático (EIA) de apelina-36 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA) según el protocolo del fabricante.

EJEMPLO 3**Resultados:**PEGilación de apelina

- Se produjeron satisfactoriamente conjugados de PEG-apelina-36 de 30 kDa y 40 kDa:* Se generaron conjugados de PEG-apelina-36 haciendo reaccionar el péptido con PEG-aldehídos a pH ácido para favorecer la conjugación del extremo N con respecto a la lisina. Para los conjugados de PEG-apelina-36 de 30 kDa y 40 kDa, casi todos los productos fueron especies mono-PEGiladas. Se detectaron significativamente más productos di-PEGilados en la reacción de PEGilación de 10 kDa. La mezcla de reacción se dializó para eliminar las cantidades traza de péptidos no reaccionados. La recuperación de conjugados de 30 kDa y 40 kDa mono-PEGilados fue >75 %. Sin embargo, la recuperación del conjugado de 10 kDa mono-PEGilado fue mucho menor (<20 %), supuestamente debido a su tamaño más pequeño. El PEG no conjugado se eliminó por cromatografía de intercambio catiónico débil con >80 % de recuperación del péptido PEGilado (Fig. 1).
- La PEGilación de apelina 36 se produjo en el extremo N y la pureza fue > 98 %:* La secuenciación del extremo N sugiere que la PEGilación de apelina-36 fue altamente selectiva para el extremo N. Cuando se secuenciaron las mismas cantidades de péptido PEGilado y no modificado, se detectaron 2 pmoles del primer residuo de apelina-36 para el péptido PEGilado en comparación con 146 pmoles del péptido no modificado, que indica ~98 % de selectividad por el extremo N (Fig. 2). Para evaluar el nivel de contaminante de péptido no reaccionado, el material final se ejecutó sobre un gel de Bis-Tris al 12 % con péptido libre. Con 8 µg de conjugado cargado, no se observó péptido libre, sugiriendo que el nivel de impureza de péptido libre era <2 %.

- La PEGilación del extremo N de apelina-36 tuvo impacto mínimo sobre la unión:* Los conjugados de PEG de 40 kDa retuvieron unión de alta afinidad con una K_i de 0,3 nM en comparación con una K_i de 0,05 nM para apelina-36 (Fig. 3). A diferencia, el conjugado de PEG-apelina-36 de 10 kDa di-PEGilado presentó una K_i de ~1 nM. El control negativo de péptido de α -MSH de 13 aminoácidos no mostró unión.

Ensayo de bioactividad (AMPC) *in vitro*

- Se identificó una línea celular clonal (HEK293-APJ#3) que expresaba un alto nivel de APJ sobre la superficie celular por análisis de citometría de flujo. Cuando se expuso a apelina-36, este clon demostró supresión de la producción de AMPC mediada por forskolina con una CI_{50} de 1 nM. Los presentes inventores buscaron a continuación determinar si la adición del resto de PEG a apelina-36 alteraría sus propiedades como agonista peptídico de APJ. Como se muestra en la Figura 4, la CI_{50} de PEG-apelina-36 se desplazó modestamente a la derecha a 1,5 nM, sin cambio en la inhibición máxima de la acumulación de AMPC mediada por forskolina frente a apelina-36. Estos resultados indican que el resto de PEG no interfiere con las propiedades agonistas de apelina-36.

Evaluación *in vivo*

- PEG-apelina 36 demostró efecto inotrópico prolongado en ratas normales:* Las ratas recibieron una infusión de 20 minutos de una dosis baja de apelina-36 o PEG-apelina-36, una dosis alta de apelina-36 o PEG-apelina-36, o solución salina, y se monitorizó la función cardíaca por ecocardiografía en momentos de tiempo especificados durante la infusión y durante 100 minutos después del final de la infusión. PEG-apelina-36 demostró efectos inotrópicos prolongados en ratas normales. Durante la infusión, los grupos de apelina-36 y PEG-apelina-36 demostraron aumentos significativos similares en la FE, observándose FE pico en el momento de tiempo 20 m. Después de terminar la infusión, la disminución en la FE fue más lenta en los grupos de PEG-apelina-36 en

comparación con los grupos de apelina-36. 30 minutos después de terminar la infusión (momento de tiempo 50 min), la FE en el grupo de dosis baja de apelina-36 (Ap36Lo) no fue significativamente diferente del nivel inicial (BL) o del grupo de solución salina normal (NS). En el grupo de dosis baja de PEG-apelina-36 (Peg36Lo), las FE aumentaron significativamente en comparación con los valores del nivel inicial y de grupos de NS durante la duración del experimento (Fig. 5a). Se observaron cambios similares en FE en los grupos de dosis alta (Fig. 5b). Las FE pico para los grupos de apelina-36 (Ap36Hi) o PEG-apelina-36 de dosis alta (PegAp36 HI) se observaron al final de la infusión IV (20 min). En el grupo de PegAp36 HI, las FE siguen por encima del BL y del grupo de NS durante la duración del experimento. En el grupo de Ap36 HI, la FE no fue significativamente diferente del nivel inicial 40 min después del final de la infusión IV (momento de tiempo 60 min) y no fue significativamente diferente del grupo de NS 100 min después del final de la infusión IV (momento de tiempo 120 min)

PEG-apelina 36 demostró efecto inotrópico prolongado y potenciado en ratas con IM: Como se observa en ratas normales, PEG-apelina-36 demostró efectos inotrópicos prolongados en ratas con IM en comparación con apelina-36 (Fig. 6). En el grupo de PEG-apelina-36 (Peg36MI), los valores de FE aumentaron significativamente en comparación con el nivel inicial y el grupo de NS (NSMI) durante la duración del experimento. Sin embargo, en el grupo de apelina-36 (Ap36MI), la FE no fue significativamente diferente de BL a los 60 min (40 min después de terminar la infusión IV) y no fue significativamente diferente del grupo de NS 120 min (100 min después del final de la infusión IV).

No hubo cambios significativos en la tensión arterial aórtica media (TAA media) en ratas normales tras tanto la administración de PEG-apelina-36 como de apelina-36 en comparación con los valores del nivel inicial, ni hubo cambios en TAA media en ratas con IM tras la administración de apelina-36 (Fig. 7).

Niveles en sangre de apelina

Cuando los animales recibieron apelina-36, el nivel en plasma de apelina-36 aumentó significativamente en comparación con el nivel inicial en los momentos de tiempo 20 min (final de la infusión IV) y 40 min (20 min después del final de la infusión IV) (2,5 y 2 veces, respectivamente). Cuando los animales recibieron PEG-apelina-36, el nivel en plasma de apelina-36 aumentó significativamente en los momentos de tiempo 10 min (durante la infusión IV), 20 min (final de la infusión IV), 40 min y 120 min (final de la monitorización) (2,5, 4, 2,7 y 2,7 veces, respectivamente) (Fig. 8). La cinética de los cambios en los niveles en sangre de apelina-36 en animales que recibieron tanto apelina-36 como PEG-apelina-36 estuvo de acuerdo con los cambios observados en la fracción de eyección (FE) cardíaca en estos animales.

La PEGilación del extremo N de apelina-36 tuvo poco efecto sobre la unión de APJ, en la que el conjugado de mono-PEG de 40 kDa tuvo una K_i de 0,3 nM (frente a K_i de 0,05 para apelina-36). El conjugado de PEG-apelina-36 de 10 kDa di-PEGilado tuvo una K_i de ~1 nM. Esta pérdida de 20 veces en la afinidad de unión fue probablemente debida a la PEGilación en una de las dos lisinas internas. La grave pérdida de afinidad de unión observada con la PEGilación del extremo N de apelina-12 y apelina-17 indicó que la PEGilación en la segunda lisina en la secuencia produciría probablemente un conjugado prácticamente inactivo. Los conjugados de apelina-36 de 30 kDa y 40 kDa tuvieron K_i similares. Como se anticipó que PEG-apelina-36 de 40 kDa tenía una vida en circulación más larga debido a su mayor masa molecular, este conjugado se seleccionó para caracterización adicional *in vitro* e *in vivo*.

La CI_{50} de PEG-apelina-36 de 40 kDa se desplazó solo 1,5 veces a la derecha, sin cambio en la inhibición máxima de la acumulación de AMPc mediada por forskolina frente a apelina-36. Estos datos indicaron que la unión de un grupo de PEG del extremo N a apelina-36 no comprometió su función como agonista de APJ, que estaba de acuerdo con el ensayo de unión a receptor mencionado anteriormente y el hecho de que tanto la apelina-36 como PEG-apelina-36 demostraran magnitudes similares de elevación de FE durante los 20 minutos de infusión de péptido en la evaluación *in vivo* de los presentes inventores.

Se anticiparon el corto tiempo en circulación de péptidos de apelina no modificados y los efectos inotrópicos transitorios. La conjugación de apelina-36 con PEG de 40 kDa aumentó la duración de su efecto inotrópico en comparación con la apelina-36, de acuerdo con los aumentos anticipados en la semivida de circulación de PEG-apelina-36. PEG-apelina-36 mantuvo elevados efectos inotrópicos durante al menos 100 minutos después del final de la infusión IV. A diferencia, con la dosis baja de apelina-36 no modificada, la FE volvió al nivel inicial y no fue significativamente diferente del grupo de NS 30 min después de la infusión IV. En el grupo de apelina-36 de dosis alta, la FE volvió al nivel inicial 40 min después de la infusión IV y no fue significativamente diferente del grupo de NS 100 min después de la infusión IV.

La infusión IV de PEG-apelina-36 demostró una extendida duración de la elevada FE en ratas con IM. De forma interesante, la magnitud de los efectos inotrópicos mediados por apelina-36 PEGilada y no modificada fue mucho mayor en ratas con IM que en las ratas normales. Los valores de FE pico (momento de tiempo 20 min para todos los grupos) en ratas con IM fueron 30 % para el grupo de apelina-36 (Ap36MI) y 40 % para el grupo de PEG-apelina-36 (Peg36MI). Los valores de FE en ratas normales que recibieron la misma dosis de apelina-36 (Ap36Lo) o PEG-apelina-36 (Peg36Lo) fueron del 18 % y 21 %, respectivamente.

Para elucidar la relación entre función cardíaca elevada y niveles en sangre de apelina-36 se usó un EIA de apelina-36 para medir los niveles en sangre de apelina-36 en animales que recibieron tanto apelina-36 como PEG-apelina-36. Se observó que este ensayo no informa en la totalidad de los niveles de apelina-36 en animales que recibieron PEG-apelina-36 posiblemente debido a la reducida afinidad de unión del anticuerpo anti-apelina por PEG-apelina-36.

5 Debido a esta cuestión, los niveles de apelina-36 en este estudio se informaron como el cambio en veces en comparación con el nivel inicial. Como se anticipó, los presentes inventores encontraron que la extendida duración de los efectos inotrópicos con PEG-apelina-36 se correspondió con una extendida duración de los niveles en sangre de apelina-36 por encima del nivel inicial.

10 En resumen, la apelina-36 PEGilada en el extremo N se produjo satisfactoriamente con alta afinidad de unión por el receptor y retuvo la actividad de agonista. Se demostraron efectos inotrópicos prolongados y extendido tiempo de circulación de PEG-apelina-36.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que podrían hacerse cambios a las realizaciones descritas anteriormente sin apartarse del amplio concepto inventivo de las mismas. Se entiende, por tanto, que la presente invención es como se define por las reivindicaciones adjuntas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genzyme Corporation

<120> APELINA PEGILADA Y USOS DE LA MISMA

20 <130> P-75918-EP

<140> EP 12757055.4

<141> 08-03-2012

25 <150> PCT/US12/999999

<151> 08-03-2012

<150> 61/451.623

<151> 11-03-2011

30

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 1

ES 2 573 337 T3

cgctcccgg ggagcccggc gcgagccgtg cagtagcagc cacgcgccgg ccagcgccag 360
 gcagcagatt gacagagcgc cccgagccat gggggcgctg gccacaagga ctgcttcttt 420
 tgcggggctc aactcggcct ttggcatcac ctgcccgtca ccttgtccct cctaaccgtc 480
 gctcgcagtc ccaggagctc aggaccacag gtgtgcgccg cgtgtcccac gccctgcacc 540
 ccgcgtggta gaggtggagg cgggggacat gcccgctccc tcgtggatcg atggaagaa 600
 ctgaccagag tcgagtgggc tgggctccca tgttgaacgt cttctggtcc ctgaaggctg 660
 ggagcctccc gccagtccag gggcgccgga aaccgggat gatgtgcaa catgcagacg 720
 tgacacttgt tgcataggca ggagtgcggg gagggggtg cggcatggag cccagctgtt 780
 gctcctttcg gcctgcatgt gtgagcagag gcagcctccc ccaggcaggg ccgggccag 840
 ccgggctggg ctggtcttct cctccctaac cccaaggctc tggctggtct cctcccctgc 900
 acaggatgcc ctccccatag cctccatccc acccccagag acttggttct cttacatcct 960
 ggctccagcc ttcctttctg tcccaggcac ggacatgctt cactttagtc tccctgccgc 1020
 taggcaccaa aggaggaagc acagcacctg acccgacccc tccctgcagc tcaggaaagg 1080
 ggagtccttt tgccctcacc tgccaatact tggcactagt gcccatgtcc gccctagcc 1140
 tggcccccaa ccacgcccc a gcagcccat cccaggctgc ctgtcctctg tgtcaatgtc 1200
 tcctggggct gccagctccc acctccagct gccacagtcc tatgatctgg ctgtcattgc 1260
 tgctgcctg gcaccacaca aggggaaggc caagaccag tggactaacg ccaggaccat 1320
 ggctggagtc acagggaggt gggagcagaa agaaggagaa ggcagggcag tgagtttct 1380
 ggggcaaggc cacagggccc taagtggttc caaacctcc agaacaggag gatggcatgc 1440
 agcccaggag cctccgaggg gccagccag ctctgcctgc ctctcatgc aggccacctc 1500
 ctttctctgc tcttctttt tggccctgct gtggctctgg gaacctgcc tggcttctca 1560
 gaaagggtca gtggttggg ctggcacctc ctgcctccag gtagctggcc ggtgatttct 1620
 ctattcaaga cctgaacacg aagtgaacca ccaccacagt aagaagtggg taggcctttt 1680
 ccacagaaac tcctgtcagg caggtaacag agggagcaaa agatacgaat gtaagatacg 1740
 aatgatacac cataccagcc tctcctcagg gacacctca tctggtgtca ttggcaaggc 1800
 atgacacttg cacaatacca ccacaggcaa atagtccagg gtggtgcctt cagggagaa 1860
 gaagactggg tgacagagat gttccagagg aaggtaggc tcctggatct gcacacttg 1920
 tgctcccccc agaggtgtg gggagacccc tggccaatag acaaccctc agaccctct 1980
 gggctccagc cattgggaca gtactagcaa aggggagaga gctggttca agggaagga 2040
 agtcagccag gatgcccga caccatgtgg ctggtccaga gcctgccact tcgtgcttta 2100
 attccccctg cttcattag tcactgttcc actgtgatt ggataaatc gttgccctca 2160

ES 2 573 337 T3

cattttgctc aagcctcgtg ctggaaactt tcagggctct cactgacttc tctactccct 2220
gacttctcct ggagccaagg aagggcatgt ccctggaagt ggccaccagc caagggcca 2280
ggtacacatg tctgtctccc gctggctcct gtctggggtt agaagcagga atcccagaac 2340
cactttgtcc ttggcccgga ctggcatgct gtccccagcc agagtcccca gtcaaagttc 2400
cagcctgaaa accacacttc ctctctcca cagtctgtcc tgacttgaaa tgtccacccc 2460
cgaccctctt ccacgctgcc tctcatcacc cagctaccac cactgacttc cctccactgc 2520
ctctgacctt gggatacact ttgtcttctg gactctgaga actcctggtc cagggccaag 2580
tgtccctcgg tctctgagca cccctctttt tccccttctc ctccccctcc gcaggcccag 2640
ctcaaagcct gcagtcacag tgggagtgtg aggagagcct actgtacccc tcctgctcag 2700
ggaagggcat ctctactcca tccccagtc tgcagcactaa gcaccctgtt aacctgagcc 2760
aggcctctcc tcgcaaagaa ctaaggcaag ggaagcagag ggccaccaga cagagcatga 2820
tgtatcccag ggcagcaaag ctggcactgg agacagcaca gggccctgga gaaggcgact 2880
gggatggggg gctgggcaga caaagagaca catgcaggac cacagagcag tggaggggca 2940
ttgccagcag ggtccccacc ggagcatacg tttgggcttt taaagtcata acaagacagg 3000
ccagactgag agaggaaaaa caggtgcgtc attcctgatg agactggcat gttcctgaaa 3060
agtcgcaagt acctctttgt gcattggcag ggttggagt cagatagcat gaaaagcaaa 3120
tcctgtcctc cccctgactg tggttctcag cgtggagatg ttgtagcttc gtggtgatg 3180
gcacttcagc aggcaatggc tccaatctct ctaggctcga gattgtttgg aggattgctc 3240
cagcctcctt ttacgtagca aatgagctgg aagaaaatat ttaagtgcata tagggctggc 3300
ctccatttct aaaggggaat tcttttttac agtcaagact tctgcagtga tgagaatcaa 3360
cagcctctaa tttgttcctt tggacagcat aaagccaggg tttcagatgt cagcttatct 3420
gatggtgagc cagactcaga atcaaaagta ggaacacaggt ggggtgacggg ctccagagtgc 3480
gggaggagcc agcagatctc ggtgatgctg aggacaatga gtccccaacg caatgggagg 3540
gatgcaagaa gcctggggct gctctccagg gcccggtcgg gggttcagtc agctcagagt 3600
ggttcttctc tgcagacctc agtcttagac atcttctcgg ccagagccac caaccctgct 3660
ccccatcctg acatatggcc tctagccctc cctttctgac tgccagacac tcacaatctg 3720
agcacctgga gatgatgcc tccccctcct ggcaccatgc ttctcttctc catgtctgcc 3780
accaccctga gctacaatgg cctgcaccac tgccccatcc cttctgcacc cccagcagtc 3840
gaaggtgcag aggtgagagc caagtgttga ctgtggtcac ttcacaaggc ccctaggtcc 3900
ttccccctgt ccttatcagc atcattcaga tccgcctca gtgatcaggg tgagccttgt 3960
ggggacccca gaactcaagg cagaggctga agcagctgca gtggggagct tagtgaagg 4020
ctttccttcc tttccctctc cagccccagc cccctcacag atggcgccaa gagggtagct 4080

ES 2 573 337 T3

ctatgacagt cagacagaag cagccccctt gttccatcca tacttactgc tccaaagtgc 4140
 taagataatt cttcttttaa ttctcatagg ttatgaattt aagggataag ttggcacgga 4200
 agtgtggcta gttaaccaa tgaccaagt caacagcggg gtcctcatgg gcctggcaat 4260
 ttttcttggg gaaagaggga aggagggtgc aggcttgag aatatgtgtt tatgtgtgtg 4320
 tgtgtggagg ggggtgggtat gtctgggtgt gagggggag aactgcaggc tcagaagcct 4380
 gggggaagag ggcctaagg ccaaaccac ccacttttg cccaagagga ggctgaacac 4440
 ttggaattg tgtgcaagca gaggaggact cacaaaaacc aaggagcaa ggaaggaaca 4500
 gagcgtgggg atgttgagg cagaggcaga ggggaagggg gagctgccag gggtatgatt 4560
 ggggtgtgag cagccaatgg gaggctctat ggaaactgtg agcaagtggg gggaattcct 4620
 gggtagatgg caatggggct cgagggacag ggatctagat gcaggcaaat cagatggtgt 4680
 gcagggggag agagactgtt attcattatc tctggcctca gatgctgtat ctgcacaggc 4740
 ctgtactgga cattgcacaa gtaccctgcc tggctgcctc ttcccagca ccatctcatc 4800
 tccacacact gcctgccacc accagccagg ctgtcttgg ggggtggcagc tcagcttccc 4860
 tgcattggact gcaggcttca cgagagtgg cctgcatgcc ttttccctca ctgcacccaa 4920
 ggataccctg caccacttgg attccattgt cagggctcag tctggtgtca ggaggcctct 4980
 actctaagcc tcctgacaga tgtggacaga tgtaaagagg agccccagag tgcagaatag 5040
 aagccagctg ggattgaaat ggaaggaatt tacatgagac acaggatgca ggggtgtgatc 5100
 tgggaatttc aggaggtagg gcattggtgg ggaggtacca actgcaacag cccaccccc 5160
 tcctggtgca cagacatgct gctgaaggtg accattgttt catttattca ttctcaaata 5220
 ttcatgcaat atttattggt ctctaaatct ggtctcaggt ctctaaatct ggtcacagca 5280
 tgaggcaggc tgagtcagag acctctccc ctaaacccgc ctggcccagc cccatccaact 5340
 gggaggactt ggcgccttag agatgcctaa ccaccgatga gacaccagc ggcgagatat 5400
 gagctcccta gtactcacia gtgggtcatc ctgcatatca aaggatgtag gagtacaatg 5460
 acgtgatgtt cgggatttgc tttaaaatac tgcagtcaag gaaaatagaa aagggataac 5520
 taaagcatat gtgactccat ctggataact gttgaatctg ggtgatgggt ccatggcggg 5580
 gggagggtca ttgtaatgtc atatgtctga aatgttttaa gtgtaccagt tgcaggggtg 5640
 ccgtggtgat tactgcctcc tgccccccag ccaagtacag gcgtgacaac ccaaagtgca 5700
 cccccccaa tgacgttcca aagaaagaac ccacttgtgc ctgtcagaaa catgatataa 5760
 ctgtcaaaag gacagaaagt cagctacatc aatggcaaga tgtgagtagt aggttccggt 5820
 tgtcccagga cagtgcagaa atggcaaat ttcctcaat atgaaaaaaaa gaaacaaaga 5880
 aaatctatga gaagtgccac cacatggaca gaccaccct cccgcgggcc tgtggtctgc 5940

ES 2 573 337 T3

agcccctgcc cgtttccaac aaccttcctc actaacaggc tttctccttc ctgcagggtc 6000
 cctgatgccg cttccccgatg ggaatgggct ggaagacggc aatgtccgcc acctgggtgca 6060
 gccagagggg tcaaggaatg ggccagggcc ctggcagggg ggtcggagga aattccgccg 6120
 ccagcggccc cgctctccc ataagggacc catgcctttc tgaagcaggt acttgagcct 6180
 ctgttcagtg gacagtgcta aagcggaggg agaaggacag cctagaagcc ggggtgatcct 6240
 gccgctcatc actggccaga cacatccatc aaacagtcct ggcgccacac tcacagaggg 6300
 ttagagctgg caagagagct tatggggcag ctgtctagcc cctttatfff acagacgate 6360
 tcctcgtctg aggcctagag aggggcttga tacttggggc cagtctccct tccaccctgc 6420
 tgcctggggg tggggaggct ggctgctta gagatttcta gacatcctgg tggaccttaa 6480
 tggctgggga ggggtgccc gggcaaacct acagatgtcc agttagatt gtcgccagag 6540
 ttggggaagg aggcagagag ctctaggggc tctcaggcag agaacaagag gacagttgtg 6600
 gctgtggttg cccggagctg tgagaaggag ggaagaacca aggtggcagc agagagagga 6660
 gagctgaagc ctgccccttc cctggctctg tggctgtccc actgcagtgg ggacaggcag 6720
 gcaccaactc aggggccttg ggattgaggt ttgggctgag tggagtttgg gggaaagaga 6780
 aggcggtctc ctctctctc tcctttcctg gggagttcct ttggcctagg atatgtccat 6840
 gacttctctc ttgtcatttt tgtctcctta ggactgaagg ggcccccaag tgcccacccc 6900
 cggcggttat gtctcctcca tagattggtc tcttctctg gaggcctcac gtccattcag 6960
 ctctcacctc gcacctgctg tagccaccag tgggccagc tcttctcacc tgctgcttc 7020
 cccagtggc gtgctcctgg ctgtagtttg gatgattccc gttctctcac aagaatccgt 7080
 ccagtccatc ttcttgccc ctccctggac tgactttgga gacctagccc cagaaagcct 7140
 cccttctct ccagggtcccc tccgccctag tcctgcctg tctcatctaa cgcgccaaac 7200
 cttcatttgg gccttccttc ctcatgtctg ccctgagcgc ggggtggaag tgctcccttc 7260
 tgtgggctcc agcagatccc ttgttttctt gtcagttgga cccctcacct ggctccagg 7320
 gaagaatgca gagaaaagca aggagagact ctagttaaga ggtgctggct gcggggatcc 7380
 agacagggca cattgggggc atggaagtgc caggggtggtt ttcaggagct ctggtgaagt 7440
 ggggtgagca tcagcgtttg ctcagttaag ggagaggtag agaggggccc gtgaagtcc 7500
 ttgtcacttc tcttgctta gtgtgcctcc caatactccc ttcttctgccc ccccaacccc 7560
 catccccagc tagcccaagc tccaggtcag gaggggaggg tgctgggcct gacatggcta 7620
 tataccctcc caggagtaaa agccaagcaa gaggttgttt ttgccaagaa tcacagaatg 7680
 ttagagctga caggaccctt gaaggctcact tagccttctt aggcacaacgc ctgcaaaaca 7740
 gaagcctgga gaggggagtg acctgctcag agtcattgca gagccgggat ggggaccagg 7800
 tctcccatct cctactttat gacgccctct tcctcttga tgatgtcttt tcaaagcaaa 7860

ES 2 573 337 T3

tgaagtgcct	tttcccgagg	ctggggctgg	gggtggctgg	gaggggaagg	gaagggagag	7920
gcaagctggc	tgtgaactgt	cctgttgtgg	ggctggagct	gctcccacct	ccctgaccta	7980
cccctgctgc	accattcccc	cagctgggct	ggaaggttcc	ataactggcc	agctgcccc	8040
ataactggca	gcattcccag	accagggta	ctctaataag	ggcggctcag	gactgagac	8100
taccgctcaa	cccagggtg	gttttcagga	gtccgaggta	gccttcaatc	actggactcc	8160
atggccttcc	cttcgtgttg	accggacctt	ccttccaggg	cttttccttt	gggggagcg	8220
gagaggggag	aagaaggaag	ggaagggcag	aaggaaggag	ggaagaaaag	a	8271

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de la apelina 36.
- 5 2. La molécula de la reivindicación 1, en la que dicha apelina 36 pegilada es capaz de presentar una vida en circulación prolongada o un efecto inotrópico extendido, con respecto a una apelina 36 no pegilada.
3. La molécula de la reivindicación 1, en la que dicha apelina 36 pegilada es una apelina 36 mono-pegilada o di-pegilada.
4. La molécula de la reivindicación 1, en la que dicha una o más moléculas de PEG están covalentemente unidas a dicho al menos un residuo de aminoácido, tanto directamente como mediante conector.
- 10 5. La molécula de la reivindicación 1, en la que cada molécula de PEG tiene un peso molecular que oscila de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 daltons.
6. La molécula de la reivindicación 1, en la que dicha apelina 36 pegilada comprende apelina 36 monomérica.
7. La molécula de la reivindicación 1, en la que dicha apelina 36 pegilada comprende una apelina 36 oligomérica, en la que uno o más monómeros están operativamente ligados entre sí.
- 15 8. La molécula de la reivindicación 1, en la que la apelina 36 comprende la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácidos 42-77 de SEQ ID NO: 1.
9. La molécula de la reivindicación 8, en la que dicha secuencia de aminoácidos está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos 123-234 pb de SEQ ID NO: 2.
10. Un método para producir la molécula de la reivindicación 1, que comprende la etapa de:
- 20 hacer reaccionar la apelina 36 con un conector activado de PEG-aldehído en presencia de un agente reductor para formar dicha apelina 36 pegilada en condiciones en las que el conector está covalentemente unido a un residuo de leucina en el extremo N de la apelina 36.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el agente reductor es cianoborohidruro y la etapa de hacer reaccionar se realiza a un pH de 5,0 a 7,5.
- 25 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una apelina 36 pegilada que comprende una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) operativamente ligadas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de la apelina 36, en la que dicho al menos un residuo de aminoácido es leucina.
- 30 13. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de apelina 36 pegilada de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la apelina, en la que dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad cardiovascular, una lesión por isquemia-reperusión, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, trastorno endocrino, trastorno metabólico o hipertensión pulmonar.
14. La molécula de apelina 36 pegilada para su uso según la reivindicación 13, en la que dicho al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de apelina 36 es leucina.

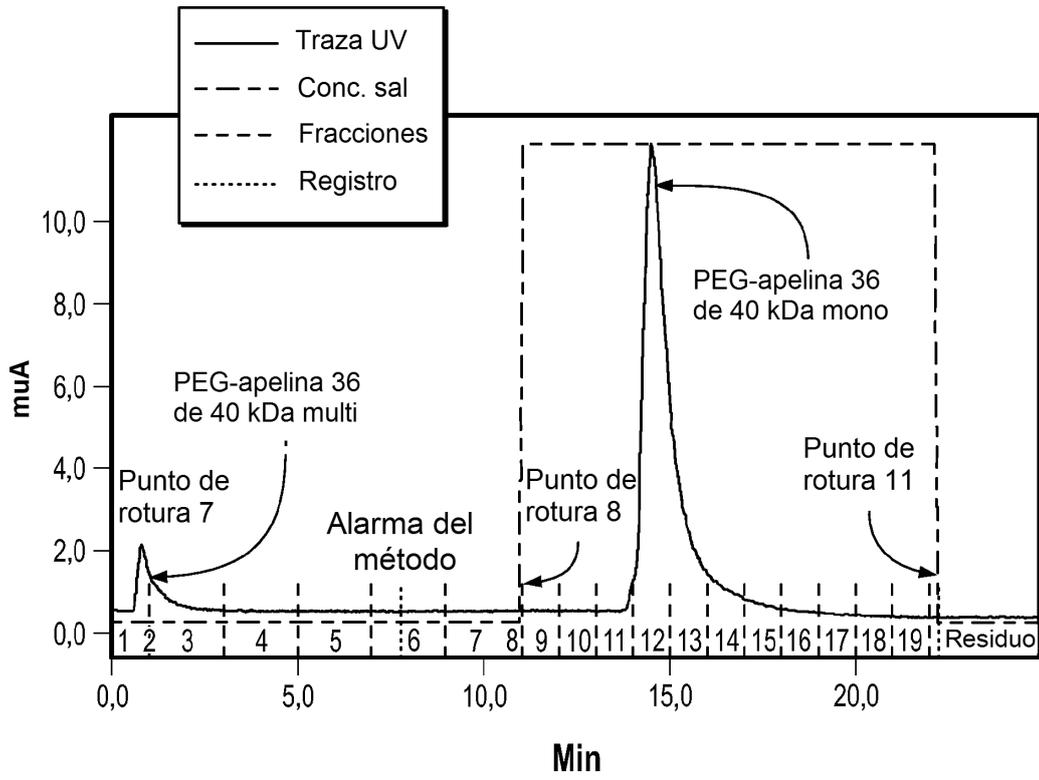


FIGURA 1

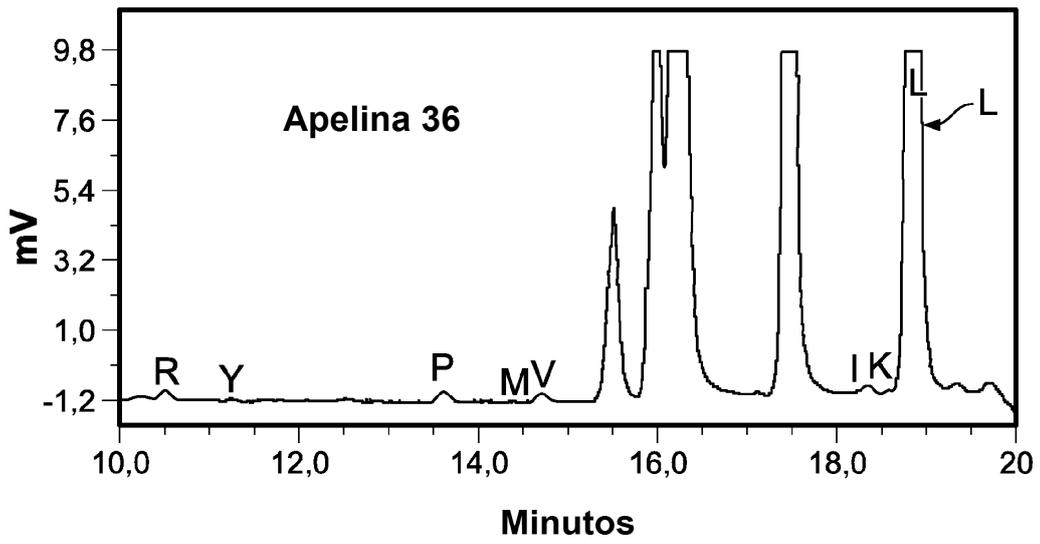


FIGURA 2A

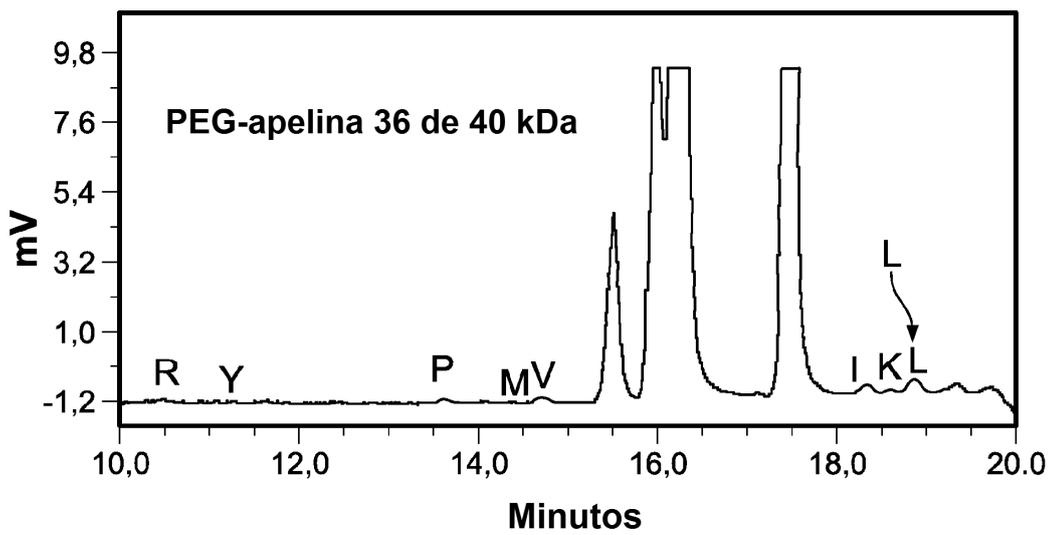


FIGURA 2B

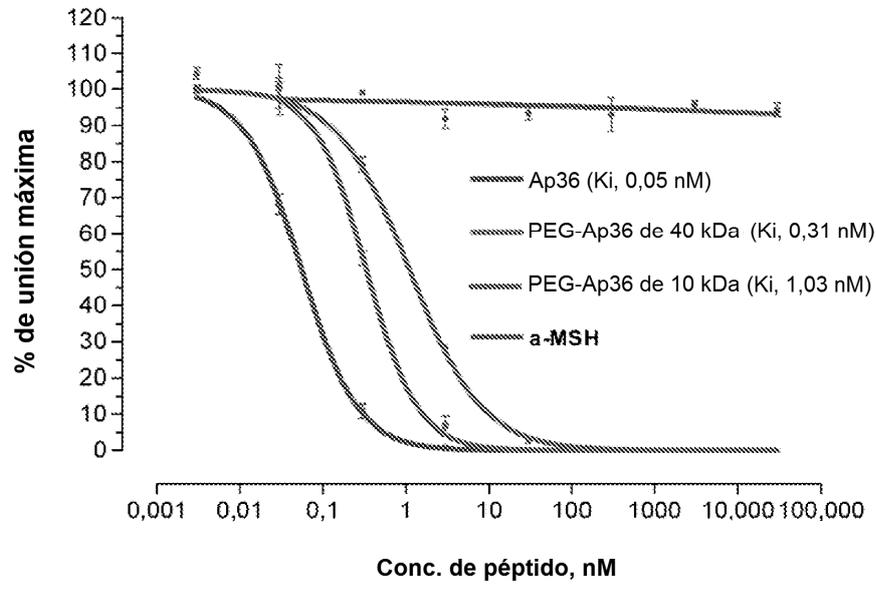


FIGURA 3

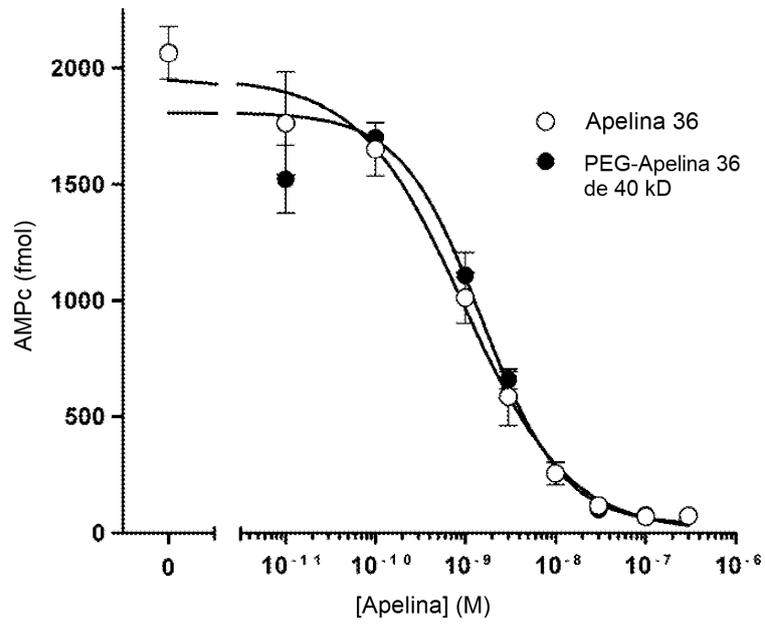


FIGURA 4

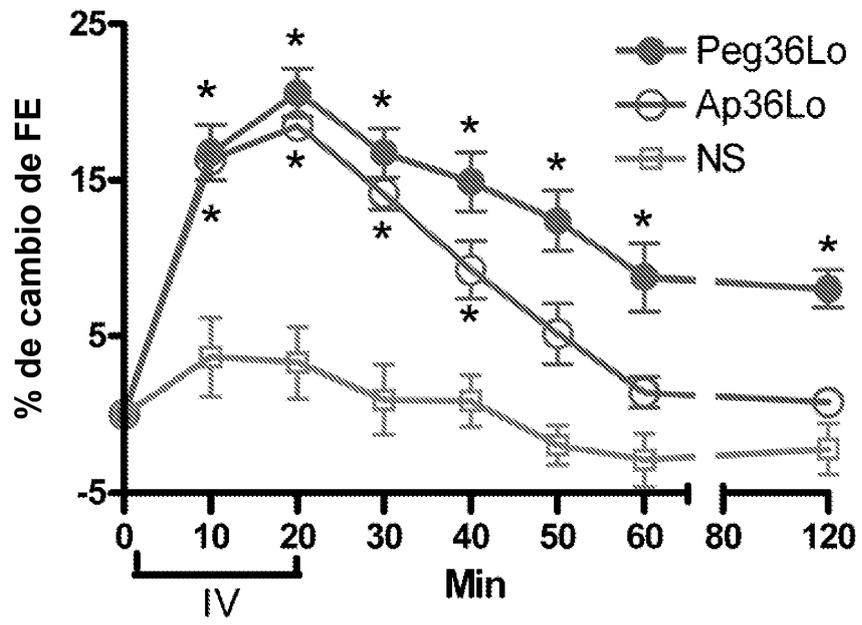


FIGURA 5A

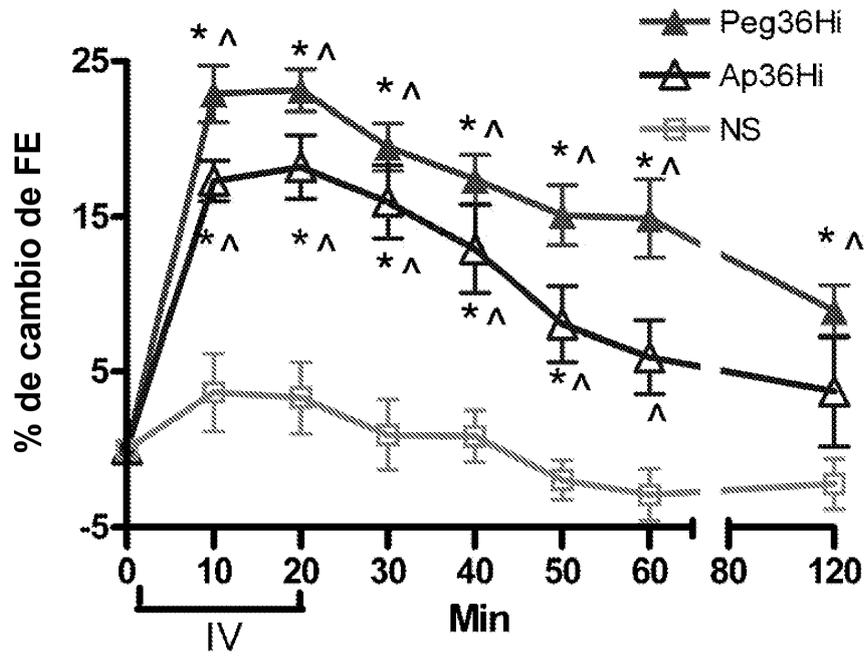


FIGURA 5B

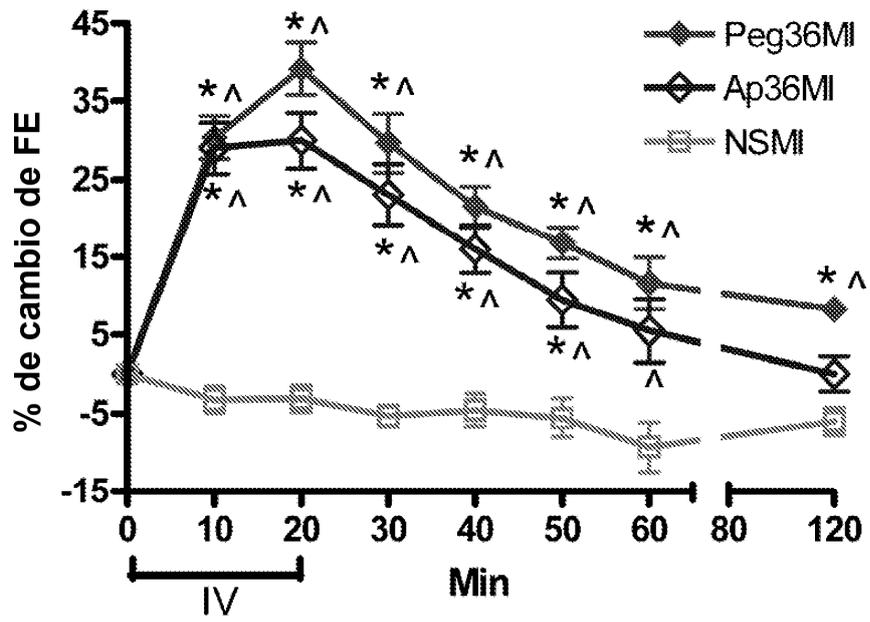


FIGURA 6

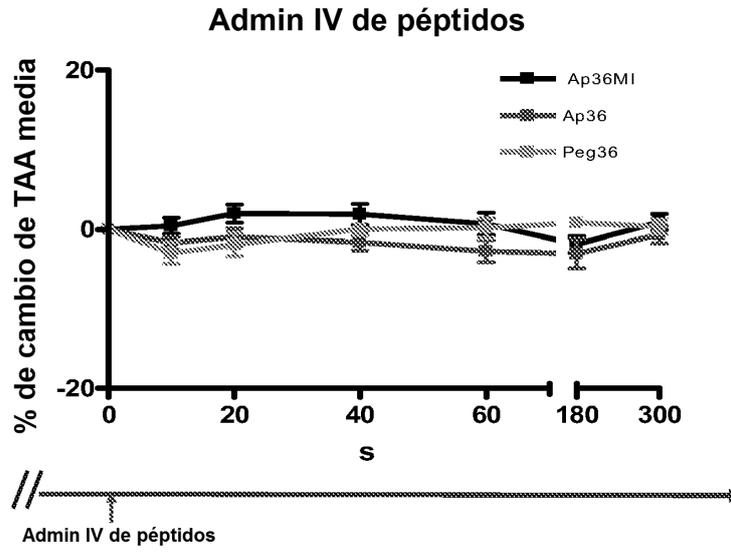


FIGURA 7

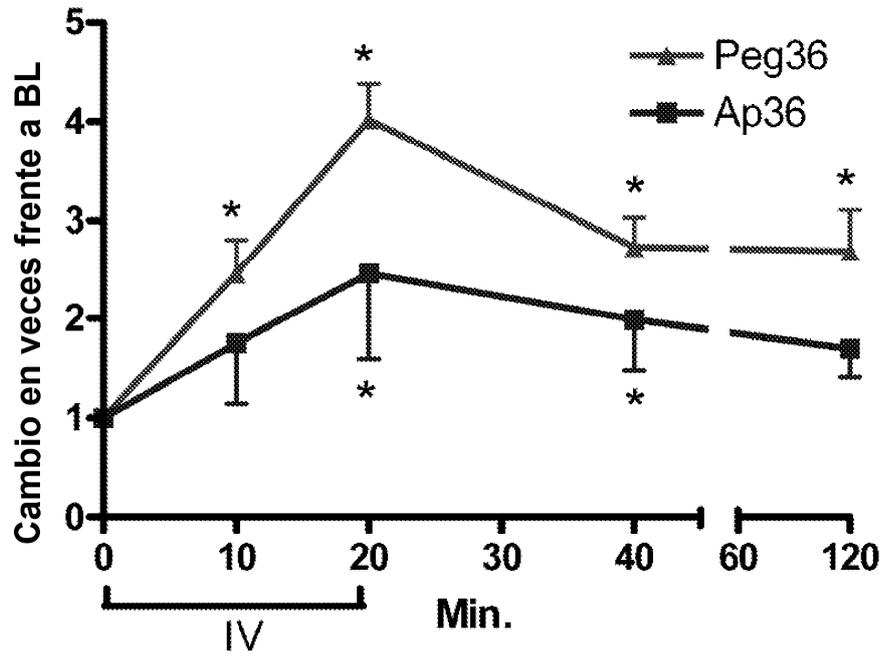


FIGURA 8