

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 871**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)

**C07K 14/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2010 PCT/IB2010/001477**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO2010140060**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10732429 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2437776**

54 Título: **Síntesis de péptido relaxina**

30 Prioridad:

**01.06.2009 GR 20090100310**

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

**14.06.2017**

73 Titular/es:

**CHEMICAL & BIOPHARMACEUTICAL  
LABORATORIES OF PATRAS S.A. (100.0%)  
Industrial Area Of Patras Building Square 1  
26000 Patras, GR**

72 Inventor/es:

**BARLOS, KLEOMENIS, K.;**  
**BARLOS, KOSTAS K. y**  
**GATOS, DIMITRIOS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

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

**ES 2 616 871 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

Síntesis de péptido relaxina

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la síntesis de péptidos, en particular a la síntesis de una hormona peptídica. La invención se refiere especialmente a la síntesis de un péptido de la familia de la insulina, en particular, a la síntesis de la relaxina.

10 En el año 1926, Frederick Hisaw [Hisaw, F. (1926) Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 23, 661 - 663] descubrió la relaxina (RLN) como una sustancia que podía relajar los ligamentos pélvicos y regular las funciones del tracto reproductor femenino. Los péptidos de la familia de la relaxina comprenden la relaxina-1 (RLN1), la relaxina-2 (RLN2) y la relaxina-3 (RLN3). Las relaxinas pertenecen a la superfamilia de péptidos similares a la insulina (INSL). Esta familia peptídica incluye a la insulina y a los péptidos similares a la insulina 3, 4, 5 y 6. Estos péptidos poseen un alto grado de similitud estructural.

Además de su función en el tracto reproductor femenino, se sabe que las relaxinas participan en diversas condiciones médicas, por ejemplo, en protección cardiaca como se divulga en Samuel, C. S. y Hewitson, T.D. (2006) Relaxin in cardiovascular and renal disease; *Kindney Int.* 69, 1498-1502; Bani, D., Nistri, S., Bani Sacchi, T. y Bigazzi, M. (2005) Basic progress and future therapeutic perspectives of relaxin in ischemic heart disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1041, 423-430; Samuel, C. S., Du, X.J., Bathgate, R. A. D. y Summers, R. J. (2006) "Relaxin" the stiffened heart and arteries: the therapeutic potential for relaxin in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 112, 529-552; Dschietzig, T., Bartsch, C., Baumann, G. y Stangl, K. (2006) Relaxin - a pleiotropic hormone and its emerging role for experimental and clinical therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 112, 38 - 56; en la fibrosis como se divulga en Bathgate, R. A. D., Hsueh, A. J. y Sherwood, O. D. (2006) Physiology and molecular biology of the relaxin peptide family. In: *Physiology of Reproduction*. (Knobil, E. and Neill, J. D., Eds), 679 - 770. Elsevier, San Diego; Sherwood, O. D. (2004) Relaxins physiological roles and other diverse actions. *Endocr. Rev.* 25, 205 - 234; Samuel, C. S. (2005) Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease. *Clin. Med. Res.* 3, 241 - 249; en reacciones alérgicas como se divulga en Bani, D. (1997) Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen. Pharmacol.* 28, 13 - 22.; en el cáncer como se divulga en Silvertown, J. D., Summerlee, A. J. y Klonisch, T. (2003) Relaxin-like peptides in cancer. *Int. J. Cancer* 107, 513 - 519; Kamat, A. A., Feng, S., Agoulnik, I. U., Kheradmand, F., Bogatcheva, N.V., Coffey, D., Sood, A. K. y Agoulnik, A. I. (2006) The role of relaxin in endometrial cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5, 71 - 77; y en la cicatrización como se divulga en Yamaguchi, Y. y Yoshikawa, K. (2001) Cutaneous wound healing: an update. *J. Dermatol.* 28, 521 - 534; 113 Wyatt, T. A., Sisson, J. H., Forget, M. A., Bennett, R. G., Hamel, F. G. y Spurzem, J. R. (2002) Relaxin stimulates bronchial epithelial cell PKA activation, migration, and ciliary beating. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 227, 1047 - 1053; Casten, G. G. y Boucek, R. J. (1958) Use of relaxin in the treatment of scleroderma. *J. Am. Med. Assoc.* 166, 319 - 324.

40 Se cree que otras aplicaciones terapéuticas de la RLN2 están asociadas a su capacidad para un control de la renovación de colágeno como se divulga en Samuel CS, Hewitson TD, Unemori EN, Tang ML, *Cell Mol Life Sci.* 2007, 64, 1539-57. *Drugs of the future: the hormone relaxin.*

45 Potencialmente, la RLN2 tiene una amplia gama de aplicaciones terapéuticas y existe una demanda significativa en cuanto a su uso en la investigación y para fines terapéuticos. En general, el potencial terapéutico de otras relaxinas no se ha investigado debido a la dificultad que presenta el producirlas o aislarlas.

La RLN está formada por dos cadenas peptídicas, normalmente referidas como la cadena A (RLNA) y la cadena B (RLNB). Las cadenas están unidas por dos puentes de cisteína intermoleculares y la cadena A contiene un puente disulfuro intramolecular adicional. La disposición de conformación de las cadenas es una característica importante de las relaxinas, en particular, de la RLN1 y RLN2 y ambas cadenas deben estar conectadas con puentes disulfuro apropiados para presentar la actividad biológica adecuada. Además, por lo general, la RLNB es muy insoluble en disoluciones acuosas. La insolubilidad de la RLNB y la necesidad de garantizar que se formen los puentes disulfuro apropiados, implica que la síntesis mediante una combinación aleatoria de cadenas sea muy difícil y que la purificación mediante, por ejemplo, métodos cromatográficos resulte difícil como se desvela en J.-G. Tang y otros, *Biochemistry* 2003, 42, 2731-2739; Wade, J. D., y Tregear, G.W. (1997) Relaxin. *Methods Enzymol.* 289, 637-646.

En los documentos US- A-4758516 y US-A-5023321, una división del documento US-A-4758516, se han desvelado métodos de producción de relaxinas utilizando técnicas de ADN recombinante. En estas patentes se desvelan genes y vectores de transferencia de ADN para la expresión de preprorelaxina humana y sus subunidades, incluidos genes y vectores de transferencia para la expresión de prorelaxina humana y de las cadenas A, B y C, junto con métodos para la síntesis de péptidos usando técnicas de ADN recombinante.

65 El documento US- A-5464756 desvela un proceso para escindir un péptido en dos componentes polipeptídicos, tratando una forma reducida de cisteína libre del polipéptido con un agente de escisión y, en particular, cultivando células que contienen ADN que codifica el polipéptido y en presencia de al menos un codón de Asp en la posición

que se va a escindir, de tal modo que el ADN se exprese para producir el polipéptido en el cultivo celular huésped y tratando la forma de cisteína libre del polipéptido con ácido diluido para efectuar la escisión deseada.

5 Las técnicas de ADN recombinante pueden ser extensas, complejas e insatisfactorias para la producción de relaxinas a gran escala. Además, como las materias usadas en estas técnicas tienen base animal, pueden surgir objeciones por motivos religiosos o por razones éticas contra el uso de relaxinas producidas con tales métodos, limitando la utilidad de productos de relaxina generados de esta manera.

10 La síntesis química de las relaxinas ha resultado, generalmente, problemática. La síntesis química de la RNL1 no es conocida y, en consecuencia, tampoco lo es la investigación de posibles usos terapéuticos de una RLN1 sintética.

15 E. Bullesbach y C. Schwabe, Journal Biol. Chem. 1991, 266, 10754-10761; E. Bullesbach y C. Schwabe, J. Biol. Chem. 2005, 280, 14586-14590, desvelan la síntesis química de la RLN2. Este proceso engloba la síntesis en fase sólida de cada una de las cadenas y su combinación dirigida de sitio, es decir, protegiendo un resto de cisteína específico para garantizar que restos predeterminados de cisteína se combinen formando un puente disulfuro específico. Tras la unión de las cadenas, son necesarias dos etapas de reacción que requieran la aplicación de fluoruro de hidrógeno y tres etapas de reacción para la combinación de cadenas dirigidas de sitio a fin de completar la síntesis de la RLN2. Sin embargo, este método es muy laborioso, tiene escaso rendimiento y requiere el uso indeseado de fluoruros de hidrógeno altamente tóxicos y dañinos.

20 El documento US- A-4835251 desvela un método en el que se combina una cadena A de relaxina humana con una cadena B de relaxina humana para producir relaxina humana biológicamente activa, mezclando una forma reducida de cisteína libre de la cadena A y una forma reducida de cisteína libre de la cadena B en un medio acuoso a un pH de 7 a 12 con oxígeno, en el que la cadena B, no el producto, está desnaturalizada.

25 El documento EP0251615A2 describe la producción de relaxina humana o de sus análogos por combinación de sus cadenas A y B en condiciones que son levemente desnaturalizantes para la cadena B de relaxina.

30 El documento WO1990013659 describe un proceso para escindir un polipéptido en al menos dos componentes polipeptídicos que comprende tratar una forma reducida de cisteína libre del polipéptido con un agente de escisión en condiciones que permiten la escisión del polipéptido en una unión deseada entre los productos de escisión del polipéptido.

35 Sin embargo, los intentos para producir relaxinas humanas sintéticas no han dado resultados satisfactorios. La cadena B de la relaxina humana-1 (RLN1B) y la de la relaxina humana-2 (RLN2B) y péptidos y fragmentos intermedios más pequeños, son sumamente insolubles o hidrófobos y han surgido dificultades al extender la cadena peptídica por la secuencia Ala-Gln-Ile-Ala-Ile-Cys de RLN1B y RLN2B. Las rutas de la síntesis en fase sólida comprenden etapas de acoplamiento y de desprotección complicadas. Es más, se han encontrado dificultades para formar las combinaciones apropiadas de puentes disulfuro entre las cadenas de RLN1B y RLN2B y las cadenas A de relaxina correspondientes, debido a la insolubilidad de las cadenas B lo que lleva a precipitaciones indeseadas o a la no disolución de las cadenas B durante la síntesis de la relaxina.

#### Sumario de la invención

45 Existe la necesidad de un método para producir péptidos similares a la insulina, por ejemplo relaxinas, especialmente relaxinas humanas, sin utilizar técnicas de ADN recombinante y que no suponga procesos prolongados y complejos ni el uso de reactivos peligrosos. Además, la producción de relaxinas sin recurrir a técnicas de ADN recombinante, proporcionaría una fuente de material y sería particularmente beneficiosa al facilitar que se investigasen posibles aplicaciones terapéuticas.

50 Los autores de la invención han desarrollado una ruta sintética para la producción de péptidos similares a la insulina utilizando la mayor solubilidad de las cadenas B de péptidos y relaxinas similares a la insulina, que contienen al menos un resto de sulfóxido de metionina, especialmente, relaxina 1 y relaxina 2, productos similares a la relaxina y sus precursores, por ejemplo, la cadena B de relaxinas.

55 En particular, la presente solicitud proporciona una síntesis química mejorada de RLN2 (cuya estructura se muestra en la figura 2) y una síntesis química nueva de RLN1 (cuya estructura se muestra en la figura 1), de RLN1B, RLN2B, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B (cuyas estructuras se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente).

60 En una realización, se proporciona un proceso para la producción de un péptido similar a la insulina que tiene al menos dos cadenas peptídicas, A y B, estando las cadenas A y B enlazadas por al menos un puente disulfuro, cuyo proceso comprende:

65 proporcionar una cadena peptídica A totalmente desprotegida y una cadena B totalmente desprotegida, conteniendo cada cadena al menos un resto de cisteína y, opcionalmente, teniendo cada cadena un puente disulfuro intramolecular, y conteniendo la cadena B un resto oxidado de metionina;

combinar la cadena A totalmente desprotegida y la cadena B totalmente desprotegida en condiciones tales que se forme al menos un puente disulfuro intramolecular para enlazar la cadena A y la cadena B; y

reducir el resto de metionina oxidado para producir el péptido similar a la insulina.

5 El péptido similar a la insulina es, adecuadamente, una relaxina, por ejemplo, relaxina 1 y relaxina 2, y la cadena A es una cadena A de relaxina y la cadena B es una cadena B de relaxina. El resto de metionina oxidado es, adecuadamente, un resto de óxido de metionina y el resto se encuentra en la cadena B.

10 En otra realización, se proporciona un proceso para la producción de una relaxina biológicamente activa que comprende, proporcionar una cadena A de relaxina que tenga al menos un puente disulfuro intramolecular y una cadena B de relaxina en la que al menos un resto de metionina de la cadena B se ha oxidado, opcionalmente, conteniendo la cadena B un puente disulfuro intramolecular, combinar la cadena A y la cadena B en condiciones tales que se forme al menos un puente disulfuro intermolecular entre la cadena A y la cadena B para enlazar las cadenas y reducir el resto de metionina oxidado para producir la relaxina.

15 En otro aspecto de la invención, la relaxina es relaxina 1 o relaxina 2 y la cadena A es una cadena A de relaxina y la cadena B es una cadena B de relaxina y en el que en combinación con la cadena A:

20 al menos una proporción de la cadena B no tiene un puente disulfuro intramolecular; o está presente un agente reductor para reducir un puente disulfuro intramolecular de la cadena B.

En un aspecto de la solicitud, la relaxina es relaxina humana y en un aspecto en particular, la relaxina es relaxina humana 1, en la que la cadena B es Met(O)<sup>24</sup>RLN1B o relaxina humana 2, en la que la cadena B es Met(O)<sup>25</sup>RLN2B.

25 En otro aspecto, la cadena B de una relaxina que contiene uno o más restos de sulfóxido de metionina presenta un grado de solubilidad mayor que la correspondiente cadena B de una relaxina que no posee un resto de sulfóxido de metionina. En particular, la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B humanas, poseen propiedades de solubilidad mayores que las cadenas RLN1B y RLN2B, respectivamente. La mayor solubilidad del análogo de sulfóxido de metionina posibilita una síntesis simple de relaxinas y de la cadena B y, la purificación y aplicación en reacciones de combinación intercadena para producir una relaxina biológicamente activa.

30 La reacción de combinación intercadena se realiza, adecuadamente, en una solución acuosa a temperatura ambiente y a un pH neutro o, preferiblemente, alcalino. La reacción intercadena puede llevarse a cabo en presencia de un agente oxidante o un agente reductor. La forma reducida de la cadena B, es decir, con grupos de cisteína libre, puede actuar como catalizador en la reacción intercadena y puede no requerir un agente oxidante o agente reductor distinto. En una realización preferida, está presente un agente reductor y este agente reductor se selecciona de la cadena A que tiene un resto de cisteína libre y de la cadena B que tiene un resto de cisteína libre.

35 En otro aspecto, la cadena A está presente en al menos un nivel estequiométrico equivalente a la cadena B y, de ser posible, se encuentra en exceso estequiométrico, de ser posible, en una base molar mayor que 1:1 a 3:1 y, preferiblemente, de 1.01 a 2:1.

40 En otra realización preferida, la cadena B tiene un grupo de cisteína libre y la cadena A un puente disulfuro intramolecular.

45 En otra realización preferida, el péptido es una relaxina seleccionada de la relaxina 1 y la relaxina 2 y la cadena A tiene dos puentes disulfuro intramoleculares y al menos una proporción de la cadena B no tiene un puente disulfuro intramolecular.

En otra realización preferida, la cadena A de relaxina totalmente desprotegida tiene al menos un puente disulfuro intramolecular.

50 El resto de metionina oxidado puede reducirse utilizando cualquier agente reductor conocido, apropiado para la reducción en la síntesis de péptidos y, de ser posible, específico para la reducción de un resto de metionina oxidado. Se prefiere el yoduro, por ejemplo, yoduro de amonio.

55 En otra realización para llevar a cabo la reacción intercadena, la cadena de relaxina A se encuentra, adecuadamente, en forma bicíclica y la cadena B de relaxina con metionina oxidada se presenta en forma cíclica o en forma completamente reducida.

En una realización preferida, el péptido similar a la insulina es un óxido de metionina que contiene relaxina y se produce combinando:

60 la cadena A de relaxina linear totalmente desprotegida y la cadena B de relaxina linear totalmente desprotegida; la cadena A de relaxina linear totalmente desprotegida y la cadena B de relaxina cíclica totalmente desprotegida; o una cadena A de relaxina monocíclica o bicíclica totalmente desprotegida y una cadena B de relaxina linear totalmente desprotegida; y oxidando el producto resultante.

65

En otra realización preferida, el péptido similar a la insulina es un óxido de metionina que contiene relaxina y se produce combinando la cadena A de relaxina monocíclica o bicíclica totalmente desprotegida y la cadena B de relaxina cíclica totalmente desprotegida en presencia de un agente reductor.

5 En otro aspecto, se proporciona relaxina humana 1 producida sintéticamente, cuya estructura se muestra en la figura 1, y una sal, derivado o profármaco de la misma farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, se proporciona un proceso para la producción de un péptido similar a la insulina que tiene al menos dos cadenas peptídicas, A y B, estando la cadena A y la cadena B enlazadas por al menos un puente disulfuro y teniendo la cadena B al menos un resto de metionina oxidado, cuyo proceso comprende:

15 proporcionar una cadena peptídica A totalmente desprotegida y una cadena B totalmente desprotegida, conteniendo cada cadena al menos un resto de cisteína y conteniendo la cadena B un resto de metionina oxidado;  
combinar la cadena A totalmente desprotegida y la cadena B totalmente desprotegida en condiciones tales que al menos un resto de cisteína en la cadena A y al menos un resto de cisteína en la cadena B se combinen para enlazar las cadenas para producir el péptido similar a la insulina que tiene un resto de metionina oxidado.

20 En otra realización, la solicitud proporciona, además, un polipéptido sintético similar a la insulina, biológicamente activo, que contiene uno o más restos de sulfóxido de metionina, por ejemplo, Met(O)<sup>24</sup>-relaxina 1 humana, que tiene una secuencia como la ilustrada en la figura 3 y Met(O)<sup>25</sup>-relaxina 2 humana, que tiene una secuencia como la ilustrada en la figura 4, y una sal, derivado o profármaco de la misma farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, el polipéptido sintético similar a la insulina es una relaxina. En otro aspecto, el polipéptido sintético similar a la insulina es una relaxina humana.

25 La cadena de relaxina A puede producirse mediante diversos métodos, que incluyen, opcionalmente, el uso de grupos protectores conocidos para sintetizar la cadena peptídica y la cadena se somete, adecuadamente, a una reacción de ciclado, en la que se forman uno o más puentes disulfuro intramoleculares, por ejemplo, como se muestra en las Figuras 9 a 14.

30 La solicitud proporciona adicionalmente un polipéptido sintético quimérico que comprende toda o parte de una secuencia polipeptídica de una relaxina sintética y una secuencia polipeptídica no derivada de una relaxina.

35 La solicitud también proporciona un polipéptido sintético que comprende toda o parte de una secuencia polipeptídica de una relaxina sintética, preferiblemente, una cadena B de una relaxina sintética y que, opcionalmente, contiene uno o más restos de sulfóxido de metionina.

40 Los péptidos similares a la insulina de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento son adecuados para su uso en aplicaciones terapéuticas.

45 La presente solicitud proporciona, además, un polipéptido sintético similar a la insulina, conforme a la invención y una sal, un derivado y un profármaco de la misma, farmacéuticamente aceptable, para su uso en uno o más de, un tratamiento de una afección cardíaca, fibrosis, repuesta alérgica, cáncer, cicatrización o en el tratamiento de una afección que requiera un control de la renovación de colágeno.

50 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido sintético, preferiblemente una relaxina sintética, por ejemplo, relaxina-1 sintética, relaxina-2 sintética y una relaxina sintética que tenga al menos un resto de sulfóxido de metionina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La mayor solubilidad de los polipéptidos similares a la insulina que tienen un resto de sulfóxido de metionina en comparación con sus análogos sin el sulfóxido, permite una mayor flexibilidad en la formulación, hace que sean especialmente aptos para su uso en la formulación de una composición farmacéutica y puede proporcionar una bioactividad potenciada, así como tener características deseadas para permitir la formación de una relaxina sintética.

De manera adecuada, el resto de sulfóxido de metionina, señalado como "Met(O)" en el presente documento, puede introducirse en las posiciones requeridas de la cadena peptídica usando derivados de Met(O) N protegidos, conocidos en la técnica. Alternativamente, el Met(O) puede introducirse añadiendo una metionina a la cadena peptídica y oxidándolo a un resto óxido de metionina.

60 La invención y las rutas sintéticas representativas se ilustran en las figuras adjuntas, en las cuales:

65 La figura 1 muestra la estructura (secuencia) de la relaxina 1 humana sintética (shRLN1);  
 La figura 2 muestra la estructura (secuencia) de la relaxina 2 humana sintética (shRLN2);  
 La figura 3 muestra la estructura (secuencia) de relaxina 1 humana sintética B-Met(O)<sup>24</sup> (B-Met(O)<sup>24</sup>shRLN1);  
 La figura 4 muestra la estructura (secuencia) de relaxina 2 humana sintética Met(O)<sup>25</sup> (Met(O)<sup>25</sup>shRLN2);  
 La figura 5 muestra la oxidación con DMSO: Síntesis de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> reducida (lineal)

[compuesto 9, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B], de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> oxidada (cíclica) [compuesto 10, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B] y de la cadena B de relaxina 1 humana oxidada (cíclica) [compuesto 11, shRLN1B];

La figura 6 muestra la oxidación con DMSO: Síntesis de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> reducida (lineal) [compuesto 13, Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B], de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> oxidada (cíclica) [compuesto 14, Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B] y de la cadena B de relaxina 2 humana oxidada (cíclica) [compuesto 15, shRLN2B];

La figura 7 muestra la oxidación con yodo; Síntesis de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> oxidada (cíclica) [compuesto 10, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B];

La figura 8 muestra la síntesis de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> oxidada (cíclica) [compuesto 14, Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B];

La figura 9 muestra la síntesis de RLN1A bicíclica [compuesto 24] con la aplicación de los grupos protectores S-Mmt y Trt;

La figura 10 muestra la síntesis de la cadena A de relaxina 2 humana bicíclica [compuesto 28; RLN2A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Mmt y Trt;

La figura 11 muestra la síntesis de la cadena A de relaxina 1 humana bicíclica [cadena RLN1A; compuesto 24; RLN1A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Acm y Trt;

La figura 12 muestra la síntesis de la cadena A de relaxina 2 humana bicíclica [compuesto 19; RLN2A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Acm y Trt;

La figura 13 muestra la síntesis de una mezcla de la cadena A de relaxina humana 1 sintética bicíclica [compuesto 24, 35-36; RLN1A bicíclica] por oxidación con DMSO de la cadena A de relaxina 1 de la cadena lineal;

La figura 14 muestra la síntesis de una mezcla de la cadena A de relaxina humana 2 [compuestos 28, 39-40; RLN2A bicíclica] por oxidación con DMSO de la cadena A de relaxina 2 de la cadena lineal;

La figura 15 muestra ejemplos de resinas del tipo de los tritilos y los bencidrilos usadas en la síntesis de las cadenas de relaxinas A y B;

La figura 16 muestra la síntesis de Met(O)<sup>24</sup>-relaxina 1 [Met(O)<sup>24</sup>-RLN1; compuesto 3] y de la relaxina 1 [RLN1; compuesto 1] por combinación de las cadenas de RLN1A bicíclica y Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B reducida;

La figura 17 muestra la síntesis de Met(O)<sup>24</sup>-relaxina 1 [Met(O)<sup>24</sup>-RLN1] por combinación de las cadenas de RLN1A bicíclica y RLN1B cíclica y una pequeña cantidad de la cadena de RLN1B lineal;

La figura 18 muestra la síntesis de Met(O)<sup>25</sup>-RLN2] y de RLN2 por combinación de las cadenas RLN2A bicíclica y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B reducida;

La figura 19 muestra la síntesis de la relaxina 2 humana [RLN2, compuesto 2] y Met(O)<sup>25</sup> relaxina 2 humana [Met(O)<sup>25</sup>-RLN2]; [compuesto 4] por combinación de cadenas de la RLN2A bicíclica y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica y una pequeña cantidad de la cadena RLN2B lineal.

Los derivados pueden incluir Fmoc-Met(O)-OH, Boc-Met(O)-OH y Trt-Met(O)-OH, como se ilustra en las figuras 5-8, y como se proporciona en el presente documento.

La preparación de una RLNB que contenga Met(O) puede llevarse a cabo, adecuadamente, a través de la oxidación sobre resina de los restos de Met como se ilustra en las figuras 5 y 6. Este proceso se lleva a cabo, adecuadamente, empleando un agente oxidante y un disolvente. En un aspecto particular, los agentes oxidantes incluyen peróxido de hidrógeno y peróxido de 2-clorobenzoilo. Se emplea, adecuadamente, un disolvente orgánico, por ejemplo, tetrahidrofurano.

Las figuras 5 y 6 ilustran ejemplos de la síntesis de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> [Met(O)<sup>24</sup>-hRLN1B] y de la correspondiente secuencia de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> [Met(O)<sup>25</sup>-hRLN2B].

La RLN2B puede contener un Met(O) en la posición 25 de la cadena peptídica, en la posición 4 de la cadena peptídica o en ambas posiciones 4 y 25, si se desea. La RLN2B que contiene Met(O) solo en la posición 4 revela, además, un grado de solubilidad mayor en comparación con la análoga no oxidada. En un aspecto, la presente solicitud permite la formación de los puentes disulfuro intra e intermoleculares correctos en las relaxinas.

La oxidación de los grupos tiol de la cisteína para formar los puentes disulfuro intramoleculares puede realizarse utilizando un oxidante apropiado, pero preferentemente utilizando DMSO (J. P. Tam, y otros. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6657-6662), en particular, donde las cadenas RLNA y RLNB están desprotegidas, por ejemplo, como se muestra en las figuras 5 y 6, y con yodo en los casos en los que la oxidación se lleva a cabo con péptidos protegidos o parcialmente protegidos, como se muestra en las figuras 7-12.

La cadena A y la cadena B de la relaxina están adecuadamente purificadas. La reacción, adecuadamente una reacción de oxidación, a la que los restos de cisteína se someten para formar el puente disulfuro intramolecular, puede realizarse antes o después de la purificación de la cadena A y/o de la cadena B individual.

Al sintetizar el péptido, pueden emplearse grupos protectores conocidos según se desee. Los grupos protectores pueden eliminarse antes de formar el puente disulfuro o pueden conservarse y la formación del puente disulfuro puede realizarse con el péptido en forma protegida. Los grupos protectores estándar que pueden emplearse en la síntesis de péptidos se desvelan, por ejemplo, en Barany y Merrifield "The Peptides" Vol.2 Ed. Gross y Minehoffer,

Academic Press, pág.233-240 (1980), cuya divulgación se incorporado en el presente documento.

La síntesis de cualquiera de las cadenas A y B o de ambas puede realizarse sobre un soporte sólido. La formación del puente disulfuro puede tener lugar en la resina, tras la escisión del péptido de la resina o simultáneamente con su escisión de la resina, según se prefiera.

El grupo tiol del resto de cisteína puede protegerse, adecuadamente, durante el proceso de ensamblaje peptídico, empleando cualquier grupo protector conocido en la materia de protección de tioles. Se utilizan preferiblemente, los grupos 4-monometoxitritilo (Mmt) (Barlos y otros. *Int J Pept Protein Res.* 1996, 47, 148-153), tritilo (Ttr) y acetamidometilo (Acm).

Además de la sorprendente mejora en la solubilidad de la cadena B, debido a la presencia del resto de metionina oxidado, pueden obtenerse otras mejoras en la solubilidad de la cadena A y la cadena B. Una vez que los puentes disulfuro intramoleculares se han formado, la elución de la cadena cíclica es más rápida en la Cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (por sus siglas en inglés) analítica y preparativa, en comparación con los correspondientes péptidos reducidos y también con otras impurezas. Puede obtenerse un nivel de pureza más alto para la cadena A y la cadena B si tienen puentes disulfuro intramoleculares (por ejemplo, los péptidos cíclicos INSL) en comparación con una correspondiente de la cadena A y cadena B lineal. Por consiguiente, puede obtenerse una pureza más alta a partir de péptidos cíclicos INSL que la que puede obtenerse a partir de la cadena individual A y la cadena individual B. En ciertos aspectos, los péptidos cíclicos INSL se obtienen con una pureza superior al 95%, 96%, 97%, 98% y 99%.

Para la formación selectiva de los puentes disulfuro intramoleculares en la cadena A puede usarse cualquier par del grupo protector tiol ortogonal, pero es preferible usar uno de los pares Trt/Mmt, Trt/Acm y Mmt/Acm. En las figuras 9 a 12 se muestran ejemplos de la preparación de las cadenas A bicíclicas RLN1 y RLN2.

En el caso de utilizar el par Trt/Mmt puede retirarse el grupo S-Mmt de manera selectiva, seguido de la formación de puentes disulfuro entre las funciones tiol liberadas por su oxidación con un agente oxidante apropiado, tal como DMSO o aire, como se muestra en las figuras 9 a 10.

La eliminación de los grupos S-Trt y la oxidación de las funciones tiol liberadas, conducen, adecuadamente, a la formación del segundo puente disulfuro. Preferiblemente, el segundo puente disulfuro se crea por la eliminación oxidativa de los grupos S-Trt o S-Acm con yodo. Al usar la resina 2-clorotritilo (K. Barlos y otros, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 37, 513-520) o una resina con una sensibilidad al ácido similar para la síntesis en fase sólida de las cadenas A, la eliminación selectiva de las funciones de S-Mmt mediante acidólisis suave, puede llevarse a cabo a partir de la resina favorablemente y de forma simultánea con la escisión del péptido protegido.

Para la eliminación oxidativa de la función S-Trt seguida de la formación del puente disulfuro, puede usarse cualquier oxidante conocido en la materia, pero se prefiere el yodo.

Cuando se emplea el par Trt/Acm, puede eliminarse selectivamente el grupo S-Trt en la presencia de grupos S-Acm por tratamiento acidolítico de la resina peptídica con una solución de un ácido apropiado, preferiblemente, ácido trifluoroacético en diclorometano en una concentración de 10-100% de ácido trifluoroacético y, añadiendo, adecuadamente, eliminadores, como tioles, silanos y agua en proporciones eficaces. La formación del primer puente disulfuro se realiza después, adecuadamente, por oxidación con cualquier agente oxidante conocido en la materia, preferiblemente con DMSO o aire.

La formación del primer puente disulfuro puede realizarse también usando yodo para la eliminación oxidativa de las funciones S-Trt cuando están presentes. Esto puede ocurrir antes, durante o después de la escisión del péptido protegido de la resina (K. Barlos y otros, *Int. J. of Peptide & Protein Research*, 1991, 38, 562-568).

Adecuadamente, y sin querer estar sujeto a ninguna teoría, el puente disulfuro requerido puede crearse de manera selectiva, en la presencia de grupos S-Acm si la yodólisis se realiza a baja temperatura, por ejemplo, de 0 °C a 15 °C. La reacción se lleva a cabo, adecuadamente, en un disolvente lipófilo, preferiblemente un hidrocarburo clorado, por ejemplo, diclorometano y alcohol fluorado, por ejemplo, trifluoroetanol y un ácido suave, por ejemplo, ácido acético y trifluoroacético como se ilustra en las figuras 11-12.

En otra realización, puede formarse el segundo puente disulfuro por yodólisis en disolventes con más polares, añadiendo componentes polares, por ejemplo, ácido acético, metanol, trifluoroetanol, ácido trifluoroacético y/o agua en la mezcla de reacción. La temperatura durante la oxidación, en especial durante la yodólisis no es crucial, pero se realiza preferiblemente en el intervalo de 5 a 25 °C.

Las relaxinas se sintetizan, adecuadamente, en la fase sólida. En una realización preferida, se puede utilizar cualquier resina conocida en la materia, pero es preferible que la síntesis se lleve a cabo sobre una resina o conector del tipo tritilo, por ejemplo, la resina de tipo cloruro 2-clorotritilo, como se muestra en la figura 15 (K. Barlos, y otros, *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 3943; K. Barlos, y otros, *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 3947; K. Barlos, y otros, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1991, 30, 590; K. Barlos, y otros., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, 37, 513; K. Barlos, y

otros, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, 38, 562) y las resinas de tipo bromuro de 4-metilbencidrilo, como en la figura 15 (K. Barlos y otros, *Liebigs Annalen der Chemie* (1989), (10), 951-5).

Se conoce el empleo de resinas de PEG con poliestireno de alto coste y baja carga en las síntesis correspondientes (E. Bullesbach y C. Schwabe). *J. Biol. Chem.* 266, 17, 10754-10761, 1991). Sin embargo, estas resinas tienen la desventaja de que la cisteína es susceptible a la racemización. Esto conlleva complicaciones y costes considerablemente más elevados, debido a la necesidad de separar los péptidos D-diastereoméricos formados por racemización con Cys durante la esterificación y ensamblaje de cadenas. Además, la escisión de los péptidos sintetizados no es cuantitativa en comparación con otras resinas conocidas, lo que conduce a costes de producción más altos.

En otra realización, se proporciona un proceso para la producción de RLN1A y RLN2A en una síntesis en fase sólida usando una resina o conector del tipo tritol, por ejemplo, la resina de tipo cloruro 2-clorotritilo y la resina de tipo bromuro 4-metilbencidrilo.

En la presente solicitud, se describe el uso de estas resinas en la preparación de RLN1A y RLN2A, ambas de las cuales contienen un resto de Cys en su posición carboxilo terminal. El uso de estas resinas es sumamente preferido ante otras resinas usadas en la materia, ya que se observa una mínima o ninguna racemización del resto de cisteína. De manera adecuada, en lugar de la especie ácida, se forma la especie carboxílica, para que reaccione con la resina, especialmente, con resinas de tipo tritol y de tipo bencidrilo. Además, puede conseguirse una escisión cuantitativa del péptido a partir de la resina (Fujiwara y otros, *Chem. Pharm. Bull.* 42, 724, 1994).

Durante la formación de la relaxina, la cadena A y la cadena B se combinan en condiciones eficaces para formar un puente disulfuro intramolecular y proporcionar la conformación deseada de la relaxina para proporcionar actividad biológica.

En general, y sin querer estar sujeto a ninguna teoría, los puentes disulfuro intramoleculares que contienen péptidos cíclicos (véanse los compuestos 10, 11, 14 y 15 en las figuras de 5 a 8) reaccionan más rápido que los equivalentes péptidos lineales cuando forman los enlaces S-S intercadena. Podría parecer que los péptidos cíclicos se comportasen como péptidos cíclicos activados y sometidos a unión intercadena con la segunda cadena de una manera más sencilla.

Los péptidos de cadena lineal de la cadena A se oxidan, adecuadamente, por ejemplo, con DMSO, aire u otro oxidante para producir una mezcla de isómeros de la cadena A cíclica como se ilustra en las figuras 13 y 14. La cadena B de relaxina cíclica puede producirse de forma parecida a partir de la cadena B de relaxina lineal. La relaxina puede formarse mediante una mezcla de isómeros de cadenas A bicíclicas o de cualquiera de los isómeros bicíclicos puros que reaccionan con la cadena B en forma cíclica o lineal. La reacción o interacción entre la cadena A y la cadena B se lleva a cabo, adecuadamente, en presencia de un agente oxidante o un agente reductor. Cuando está presente la cadena lineal A y, en especial, la cadena lineal B, no se requiere un agente de oxidación o de reducción adicional, aunque esto sea preferible. En otra realización, la reacción/interacción entre la cadena A y la cadena B se lleva a cabo en presencia de un agente reductor al que se puede denominar catalizador. Sin querer estar sujeto a ninguna teoría, se cree que los puentes disulfuro se reducen a tioles libres y que se establece un equilibrio entre péptidos cíclicos y péptidos ligados intercadena, lo que conduce a productos más estables desde el punto de vista termodinámico, que son las proteínas nativas RLN, como se muestra en las figuras 18 y 19.

Como agente reductor, puede utilizarse cualquier agente reductor orgánico o inorgánico, sin embargo, se emplean tioles orgánicos, por ejemplo, cadena A reducida, cadena B reducida, glutatión, cisteína, tiofenol, tioanisol, piridina-tiol, 3 o 5 nitropiridina-2-tiol, bencilmercaptano, ditiotreitolo, reducidos. En otra realización preferida pueden usarse como catalizadores la cadena A, la cadena B o combinaciones de las mismas. El catalizador puede añadirse a la mezcla antes, después o durante la mezcla de la cadena A y la cadena B.

El catalizador puede añadirse en distintas cantidades para construir mezclas de equilibrio, pero debe añadirse en una cantidad de relación molar de 1 a 5 % calculada sobre la cantidad de cadena A y cadena B. La temperatura durante la reacción de plegamiento en la que la cadena A y la cadena B se combinan, no es crucial pero debe ser alrededor de la temperatura ambiente, por ejemplo, de 20 a 25 °C. El disolvente es, adecuadamente, una solución acuosa o una mezcla de disolventes y/o bases acuosas y orgánicas. El pH de la solución para la combinación de cadenas no es crucial pero será preferiblemente alcalino y, de ser posible, de 10 a 11.

La cadena A reducida se combina (se pliega), adecuadamente, con la cadena B en presencia de un oxidante apropiado que estimula la formación de la RLN deseada. La reacción prosigue, adecuadamente, mediante la formación de mezclas de las cadenas A monocíclica y bicíclica.

En otra realización, puede utilizarse la cadena A oxidada, ya que la reacción será, generalmente, más rápida que cuando se emplea la cadena A reducida. En un aspecto, mezclas de la cadena A monocíclica y bicíclica y la cadena B reaccionan a fin de generar las RLN nativas.

En otra realización, la cadena A bicíclica se combina con la cadena B reducida, como se muestra en las figuras de 16 y 18, añadiendo DMSO, por ejemplo, DMSO al 15 %, ya que el oxidante estimula la reacción. La relación molar de las cadenas A y B puede ser de 1:1 a 2:1, o la relación molar de las cadenas A y B puede ser de 1.1:1 molar. La velocidad de reacción puede aumentarse con el incremento del exceso de la cadena A. El exceso de las cadenas A bi y monocíclica se recicla, adecuadamente, durante la purificación, por ejemplo, mediante HPLC. Cuando no se emplea un oxidante, por ejemplo DMSO, la relación molar de las cadenas A y B puede ser de al menos 4:1.

En otra realización, cuando la cadena A de relaxina o la cadena B de relaxina se forma como un subproducto en la reacción de plegamiento intercadena, el subproducto se somete a oxidación para proporcionar el análogo de metionina oxidada, que después puede participar de forma adecuada como un reactante en otra reacción de plegamiento intercadena.

Las RLN que contienen Met(O) se reducen a las proteínas nativas, de forma adecuada, con un agente reductor, por ejemplo, yoduro de amonio. El yoduro de amonio es ventajoso, ya que reduce de manera selectiva Met(O) en Met, dejando los puentes de cisteína intra e intermoleculares intactos. La reducción puede realizarse antes o después de la purificación de la cadena A y/o la cadena B. Adecuadamente, la reacción es casi cuantitativa. Como disolvente pueden usarse soluciones acuosas o mezclas de disolventes acuosos y orgánicos.

La purificación de la RLN1A, RLN2A, RLN1B, RLN2B, RLN1, RLN2, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2, puede llevarse a cabo por HPLC usando cualquier disolvente adecuado salvo ácido trifluoroacético (TFA), aunque pueden emplearse los ácidos fórmico y acético que contengan agua o acetonitrilo.

La RLN1A, RLN2A, RLN1B, RLN2B, RLN1, RLN2, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 purificada, puede aislarse, adecuadamente, por liofilización o precipitación. La desalinización, si fuera necesaria, se realiza adecuadamente, usando resinas de intercambio iónico, por ejemplo, Dowex.

#### Aplicaciones Terapéuticas:

Todos los análogos de relaxinas preparados en el presente documento se han ensayado y han demostrado tener actividad biológica similar a la de la relaxina-2 preparada recombinante. Las aplicaciones terapéuticas de los compuestos de relaxina preparados conforme a los métodos descritos en el presente documento, incluyen el tratamiento de: pancreatitis; véase CosenBinker LI et al., World K. Gastroenterol. 2006, 12:1558-1568; preeclampsia; véase Mohaupt, M. Mol. Aspects Med. 2007, 28: 169-191; artritis; véase K. Santora et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007, 322: 887-893; angiogénesis endometrial; J.E. Girling et al., Angiogenesis, 2005; 8: 89-99; insuficiencia cardiaca aguda; véase S.L. Teichman et al., Heart fail. Rev. 2009; 14: 321-329; anafilaxia cardiaca y como un nuevo agente antianafiláctico; véase Daniele Bani, et al., Curr Allergy Asthma Rep. Feb. 2006; 6 (1):14-9, 16476189; la ralentización de la progresión de enfermedad renal disminuyendo la fibrosis renal intersticial; véase S L Garber, Y Mirochnik, et al.; Kidney Int. Marzo 2001; 59 (3):876-82, 11231342; la progresión de fibrosis pulmonar relacionada con la edad; véase Chrishan S Samuel, et al., FASEB J. Ene 2003;17 (1):121-3, 12424226; reacciones de tipo asmático; véase D Bani, et al., Endocrinology. Mayo 1997; 138 (5):1909-15, 9112386; el control del crecimiento de células de cáncer de mama humano; véase M. Bigazzi et al., Cancer. 1 de agosto de 1992; 70 (3): 639-43,1320450; control de la esclerodermia; R.K. Winkelmann, et al., Semin Cutan Med Surg. Marzo 2001; 20 (1):27-37, 11308134; y el tratamiento de la ansiedad, obesidad y enfermedades relativas a la fibrosis; véase Emma T. van der Westhuizen et al., Drug Discovery Today, volumen 13, temas 15-16, agosto de 2008, págs 640-651.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Síntesis en fase sólida de la RLN1A, RLN2A, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B humanas y de sus fragmentos protegidos. Procedimiento General.

##### A1. Preparación de resinas cargadas con cloruro de 2-clorotritilo (CTC); procedimiento general:

La resina Cl-CTC se cargó (100 g; carga 1,6 mmol/g) en un reactor de péptidos de 2 l y se hinchó con 700 ml de DCM durante 30 min a 25 °C. La resina se drenó y se añadió una solución de aminoácido protegido con Fmoc 100 mmol y de diisopropiletilamina (DIEA) 300 mmol en 500 ml de diclorometano (DCM). La mezcla se agitó con nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25 °C. A continuación, los extremos de sitios activos restantes sobre las resinas de 2-CTC se protegieron añadiendo 10 ml de MeOH durante 1 hora. Las resinas se drenaron y se lavaron dos veces con 400 ml de dimetilformamida (DMF). La resina se drenó, y después se trató dos veces con 500 ml de 25 % por volumen de piperidina durante 30 min. Después, la resina se lavó cuatro veces con 500 ml de DMF. Después, la resina se deshinchó lavándola 3 veces con 500 ml de isopropanol (IPA). La resina se secó hasta un peso constante. Sobre la resina se cargaron 70-95 mmol del aminoácido usado.

##### A2. Preparación de resinas cargadas con bromuro de 4-metilbencidrilo (MBH), procedimiento general.

La resina Br-MBH (100 g, 190 mmol) se cargó en un reactor de péptidos de 2 l y se hinchó con 700 ml de DCM durante 30 min. a 25 °C. La resina se drenó y se añadió una solución de aminoácido Fmoc y DIEA en 500 ml de DCM. La mezcla se agitó con nitrógeno durante 6 horas a una temperatura de 25 °C. A continuación, los extremos de sitios activos restantes sobre las resinas de MBH se protegieron añadiendo 10 ml de MeOH durante 24 horas.

5 Las resinas se drenaron y se lavaron dos veces con 400 ml de DMF. La resina se drenó y después se trató dos veces con 500 ml de 25 % por volumen de piperidina durante 30 min. Después, la resina se lavó cuatro veces con 500 ml de DMF. Después, la resina se deshinchó lavándola 3 veces con 500 ml de IPA. La resina se secó hasta un peso constante al vacío (15 Torr, 25 °C). Sobre la resina se cargaron 60-90 mmol del aminoácido usado.

#### 10 B. Síntesis por etapas en fase sólida, protocolo general:

Se realizó la síntesis en fase sólida a 24 °C, comenzando con 1,0 gr de cada resina de aminoácido-CTC o resina MBH, cargada como se muestra en la Parte A de este ejemplo 1. Durante toda la síntesis se utilizó el siguiente protocolo:

##### 15 B1. Hinchado de la resina:

La resina se colocó en un reactor de fase sólida de 15 ml y se trató dos veces con 7 ml de N-metil pirrolidina (NMP) y se drenó.

##### 20 B2. Activación del aminoácido

El aminoácido protegido con Fmoc (3,0 equivalentes) y el 1-hidrobentotriazol (4,0 equiv.) se pesaron, se disolvieron en un recipiente de reacción con 2,5 veces el volumen de NMP y se enfriaron a 0 °C. Después se incorporó la diisopropilcarbodiimida (DIC) (3,0 equiv.) y la mezcla se agitó durante 15 min.

##### 25 B3. Acoplamiento

La solución B resultante se añadió al reactor de B1. El frasco se lavó con 1,0 veces el volumen de DCM y se añadió al reactor, el cual después se agitó durante 1-3 horas a 25-30 °C. Se extrajo una muestra para un ensayo de Kaiser para comprobar que la reacción había finalizado. Si la reacción de acoplamiento no había finalizado después de 3 horas (ensayo de Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un reacoplamiento con una disolución nueva de aminoácido activado. Después de finalizar la reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó 4 veces con NMP (5 vol. por lavado).

##### 35 B4. Retirada del grupo Fmoc

La resina obtenida en B3 se drenó, y después se trató dos veces con 5 ml de 25 % por volumen de piperidina durante 30 min. Después la resina se lavó tres veces con 5 ml de NMP.

##### 40 B5. Elongación de la cadena peptídica

Tras completar la introducción de cada aminoácido, se repitieron las etapas B2 y B5 hasta completar la cadena peptídica.

45 Para la introducción del aminoácido individual, se usaron los siguientes derivados de aminoácido protegidos con Fmoc:

50 Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Met(O)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, pGlu, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(Clt)-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH y Fmoc-Cys(Acm)-OH y los siguientes aminoácidos Boc: Boc-Arg(Pbf)-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Gln(Trt)-OH, Boc-Lys(Boc)-OH y Boc-Asp(tBu)-OH.

#### 55 C. Escisión de la cadena lateral protegida de RLNA y RLNB y de sus fragmentos protegidos, conteniendo ambos en el extremo N-terminal, grupos Fmoc o Boc de la resina de tipo CTC, procedimiento general.

60 El péptido, o fragmento peptídico, unido a la resina, obtenido como se describe anteriormente en B1 - B5, se lavó 4 veces con 5 ml de NMP, 3 veces con 5 ml de IPA y finalmente, 5 veces con 7 ml de DCM, para retirar cualquier NMP u otro contaminante básico. Después se enfrió la resina a 0 °C. Se drenó el DCM y se trató la resina dos veces con una solución previamente enfriada a 5 °C de 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 1 % /DCM, se agitó durante 20 min. a 0 °C y se filtró. Después, se lavó la resina tres veces con 10 ml de DCM. Después se añadió piperidina a los filtrados combinados (1,3 equiv. respecto a TFA) para neutralizar el TFA. Después se combinó la solución de escisión DCM con el mismo volumen de agua respecto al DCM. La mezcla resultante se destiló a presión reducida para retirar el DCM (350 Torr a 28 °C). El péptido o el fragmento peptídico se precipitó fuera del agua cuando se

65

retiró el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30-35 °C al vacío, 15 Torr.

#### Ejemplo 2

- 5 Desprotección de RLN1A, RLN2A, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B and Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B reducida lineal y de sus derivados. Procedimiento general

10 Las cadenas A de RLN protegidas obtenidas como se describe anteriormente en el ejemplo 1 (0,01 mmol) se trataron con una mezcla de 10 ml de TFA/ditiotreitol (DTT/agua (90:5:5) durante tres horas a 5 °C y durante una hora a 15 °C. A continuación se concentró la solución resultante al vacío y se precipitó mediante la adición de diisopropileter y se lavó tres veces con 10 ml de diisopropileter. El sólido obtenido se secó al vacío (25 °C, 15 Torr) a peso constante. El procedimiento se repitió con las cadenas B de RLN protegidas con grupos de metionina oxidada.

#### Ejemplo 3

- 15 Desprotección de RLN1A, RLN2A, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B and Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B mono y bicíclica. Procedimiento general:

20 La RLN protegida obtenida como se describe anteriormente en el ejemplo 1 (0,005 mmol) se trató con una mezcla de 5 ml de TFA/triisopropilsilano (TIPS)/anisol/agua (91:4:1:4) durante tres horas a 5 °C y durante una hora a 15 °C. Después se concentró la solución resultante al vacío y se precipitó mediante la adición de diisopropileter y se lavó tres veces con 5 ml de diisopropileter. El sólido obtenido se secó después al vacío (25 °C, 15 Torr) a peso constante. El procedimiento se repitió para cada cadena A y cadena B.

#### Ejemplo 4

25 Purificación de RLN1A, RLN2A, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B and Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B desprotegida y de sus derivados mono y bicíclicos, procedimiento general:

30 La sal del ácido trifluoroacético desprotegida cruda de RLN1A Met(O)<sup>24</sup> Met(O)<sup>25</sup> se disolvió en acetonitrilo al 25 % agua y se cargó sobre una columna semipreparativa de 10x25 mm. Lichospher 100, RP-18, 12 micras (Merck); Fase A = 1 %-TFA en acetonitrilo, fase B = 1 %-TFA en agua; Gradiente = gradiente lineal de 25 %-A a 65 %-A en 30 min. Los rendimientos de purificación variaron de 30 - 80 %. El procedimiento se repitió para RLN2A, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B y sus derivados mono y dioxidados.

#### Ejemplo 5

40 Escisión de la resina CTC y monooxidación simultánea de péptidos protegidos con yodo. Preparación de las cadenas A y B de relaxina humana monooxidadas, Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y Met(O)<sup>25</sup>-RLN1B y de sus fragmentos (Figuras 7 (compuestos 16 a 17), 8 (compuestos 18 a 19), 11 (compuestos 29 a 30) y 12 (compuestos 31 a 32)).

45 El extremo N y la cadena lateral del péptido, o fragmento peptídico, unido a la resina protegido, obtenido como se describe anteriormente en los ejemplos 1 y 2, se lavó 4 veces con 5 ml de NMP, 3 veces con 5 ml de IPA y finalmente, 5 veces con 7 ml de DCM para retirar cualquier NMP u otro contaminante básico. Después se enfrió la resina a 0 °C. El DCM se drenó y la resina se trató dos veces con una solución previamente enfriada a 5 °C de 10 ml de TFA al 1 % en DCM que contenía 10 equivalentes de yodo respecto al péptido unido a la resina, se agitó durante 5 min. a 0 °C y se filtró (en lugar de TFA al 1 %, se puede usar como disolvente el mismo volumen en mezclas de diclorometano/ácido acético/trifluoroetanol con un resultado similar). La resina se lavó después tres veces con 10 ml de DCM. Después, se calentaron los filtrados combinados a 15 °C y se agitaron durante 30 min. más. Después se añadió piridina (1,3 equiv. respecto a TFA) para neutralizar el TFA. La solución de escisión de DCM se combinó después con el mismo volumen de tiosulfato de sodio al 3 % o ácido ascórbico en agua respecto al DCM para destruir el exceso de yodo. Esto se manifiesta en la decoloración de la mezcla. Después se destiló la mezcla resultante a presión reducida para retirar el DCM (350 Torr a 28 °C). El péptido o fragmento peptídico protegido se precipitó fuera del agua cuando se retiró el DCM. El péptido se lavó adicionalmente con agua y se secó a 30-35 °C al vacío, 15 Torr. La desprotección y purificación se realizó como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

Los rendimientos totales variaron de 45 - 65 %. El procedimiento se repitió para cada especie.

#### Ejemplo 6

60 Síntesis de RLN1A y RLN2A humana monocíclica protegida por oxidación con DMSO. Procedimiento general:

A.1. Eliminación selectiva de Cys(Mmt). Desprotección parcial de RLN1A, RLN2A (figura 9 –compuestos 21 a 22 y figura 10 compuestos 25 a 26)

65

El extremo N y la cadena lateral del péptido, o fragmento peptídico, unido a la resina protegido, obtenido como se describe anteriormente en B1-B5 (0,005 mmol) y que contiene dos restos de Cys protegidos con Ttr y dos restos de Cys protegidos con Mmt se lavó 4 veces con 5 ml de NMP, 3 veces con 5 ml de IPA y finalmente, 5 veces con 7 ml de DCM para retirar cualquier NMP u otro contaminante básico. Después se enfrió la resina a 0 °C. El DCM se drenó y después se trató la resina cuatro veces con una disolución de 25 ml de TFA al 1,5 % previamente enfriada a 5 °C (esto es 1,1 % en cifras) en DCM que contenía 10 equivalentes de trietilsilano respecto al péptido unido a la resina, se agitó durante 5 min. a 5 °C y se filtró. Los filtrados combinados se agitaron después durante dos horas más a 15 °C. Después se añadió piridina (1,3 equivalentes respecto a TFA) para neutralizar el TFA. Se combinó después la disolución de escisión de DCM con el mismo volumen de agua respecto al DCM. Después se destiló la mezcla resultante a presión reducida para retirar el DCM (350 Torr a 28 °C). Parte de los restos S-Mmt del péptido o fragmento peptídico desprotegido se precipitaron fuera del agua cuando se retiró el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30-35 °C al vacío, 15 Torr. El procedimiento se repitió para producir RLN2A.

#### A2. Oxidación con DMSO desde cisteína libre a monocíclica

Cada uno de los péptidos obtenidos del procedimiento A1 descrito anteriormente (0,005 mmol) se disolvió en 5 ml de DMSO y se agitó durante 24 horas a 25 °C. Después se añadieron 5 ml de agua y se agitó durante 30 min más. El péptido monocíclico protegido precipitado se lavó cinco veces con agua y se secó al vacío a peso constante (30 °C, 15 Torr). La desprotección y la purificación se llevaron a cabo como se describe en ejemplos 2, 3 y 4. Los rendimientos totales variaron de 50 - 70 %.

Este procedimiento se ilustra respecto a la producción de RLN1A y RLN2A y también puede emplearse para retirar selectivamente grupos protectores sobre restos de cisteína de RLN1B y RLN2B.

#### Ejemplo 7

Síntesis de la RLN1A y la RLN2A humana bicíclica y de sus derivados, procedimiento general:

A1. Mediante oxidación con yodo de la RLN1A, la RLN2A monocíclica protegida en la que los dos restos de Cys están protegidos en la cadena lateral con Trt (Figuras 9 compuestos 22 a 23 y figura 10 compuestos 26 a 27).

La RLN1A monocíclica protegida (0,005 mmol) con dos restos de Cys protegidos con Trt, se disolvió en 5 ml de DCM/TFE (7:3). La solución se enfrió a 5 °C y después se añadieron 10 equiv. de yodo en 5 ml de DCM y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después, la solución de DCM se combinó con 5 veces su volumen con tiosulfato de sodio o ácido ascórbico al 3 % en agua respecto al DCM para destruir el exceso de yodo. Esto se manifiesta con la decoloración de la mezcla. La mezcla resultante se destiló a presión reducida para retirar el DCM (350 Torr a 28 °C). El péptido o fragmento peptídico protegido se precipitó fuera del agua cuando se retiró el DCM. El péptido protegido precipitado se lavó después con agua y se secó a 30-35 °C al vacío, 15 Torr. La desprotección y la purificación se realizaron como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4. El procedimiento se repitió con RLN2A. Los rendimientos totales variaron de 50 - 80 %.

A2. Mediante oxidación con yodo de la RLN1A y la RLN2A humana monocíclica protegida en que los dos restos de Cys están protegidos con Acn (Figura 11 compuestos 30 a 23 y figura 12 compuestos 32 a 27).

La RLN1A monocíclica protegida (0,005 mmol) con dos restos de Cys protegidos con Acn, se disolvió en 5 ml de AcOH/trifluoroetanol (TFE) (5:5). La disolución se enfrió a 5 °C y después se añadieron 20 equiv. de yodo en 5 ml de TFE y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después se combinó la solución con 5 veces su volumen con tiosulfato de sodio o ácido ascórbico al 3 % en agua para destruir el exceso de yodo. Esto se manifiesta en la decoloración de la mezcla. El péptido protegido precipitado se lavó después con agua y se secó a 30-35 °C al vacío, 15 Torr. La desprotección y la purificación se realizaron como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4. El procedimiento se repitió con la RLN2A. Los rendimientos totales variaron de 50 - 60%.

A3. Mediante oxidación con DMSO de la RLN1A y RLN2A humana monocíclica desprotegida, procedimiento general.

La RLN1A o la RLN2A monocíclica desprotegida (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de acetato de amonio a un pH de 4. Después se añadió 1 ml de DMSO y la mezcla se agitó a 15 °C durante 24 horas. De la disolución resultante el péptido bicíclico se aisló tras la purificación, como se describe en el ejemplo 4. Los rendimientos totales variaron de 65 - 85 %.

A4. Mediante oxidación con DMSO de la RLN1A y RLN2A humana lineal desprotegida, procedimiento general (Figuras 13 compuestos 34 a 24, 35 y 36 y Figura 14 compuestos 38 a 28, 39 y 40).

La RLN1A lineal desprotegida (0,005 mmol) se disolvió en 4 ml de tampón acetato de amonio a un pH de 4. Después se añadió 1 ml de DMSO y la mezcla se agitó a 15 °C durante 24 horas. De la disolución resultante se aislaron tras purificación, dos mezclas de isómeros peptídicos dicíclicos, como se muestra en el ejemplo 4. El

procedimiento se repitió con la RLN2A. Los rendimientos totales de los isómeros puros obtenidos variaron de 60 - 80 %.

#### Ejemplo 8

Síntesis de la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B humana monocíclica, procedimiento general (Figura 5 compuestos 9 a 10 y Figura 6 compuestos 13 a 14)

La Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B humana lineal desprotegida (0,005 mmol) se disolvió en 4 ml de tampón de glicinato de sodio a un pH de 10,5. Después se añadió 1 ml de DMSO y la mezcla se agitó a 15 °C durante 24 horas. De la solución resultante se aisló tras purificación, el péptido cíclico, usando el método descrito en ejemplo 4. El procedimiento se repitió con la Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B. Los rendimientos promedio de tres purificaciones fueron del 45 %.

#### Ejemplo 9

Síntesis de B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 Met(O)<sup>24</sup> humana, combinando RLN1A lineal y Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B lineal y, síntesis de B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN2, combinando RLN2A lineal y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B lineal; procedimiento general:

La RLN1A humana lineal desprotegida (0,006 mmol) y la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B Met(O)<sup>25</sup> (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de glicinato de sodio / clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10,5. Después se añadió 1 ml de DMSO durante un periodo de 12 horas y la mezcla se agitó a 15 °C otras 4 horas. De la disolución resultante se aisló tras purificación la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 Met(O)<sup>25</sup> usando el método descrito en ejemplo 4. La B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 se produjo a través del mismo procedimiento comenzando desde la RLN2A lineal y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B. Los rendimientos tuvieron un promedio en tres ejecuciones de: B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN1 37 % y B-Met(O)<sup>24</sup>-RLN2 35 %.

#### Ejemplo 10

Síntesis de B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 humana, combinando RLN1A lineal y Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B cíclica y síntesis de B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 humana, combinando RLN2A lineal y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica, procedimiento general:

La RLN1A lineal desprotegida (0,005 mmol) y Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B Met(O)<sup>25</sup> (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de glicinato de sodio / clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10, 5 y se agitó durante 5 horas a 15 °C. Después, se añadió 1 ml de DMS durante un periodo de 12 horas y la mezcla se agitó a 15 °C otras 4 horas. De la disolución resultante se aisló, tras purificación, la Met(O)<sup>24</sup>RLN1, usando el método descrito en el ejemplo 4. El procedimiento se repitió para producir la B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 humana, combinando la RLN2A lineal y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica. Los rendimientos de tres purificaciones tuvieron un promedio de: B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN1 32 % y B-Met(O)<sup>24</sup>-RLN2 67 %, basado en la cadena B aplicada.

#### Ejemplo 11

Síntesis de B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 y B-Met<sup>25</sup>(O)-RLN2, combinando RLN1A o RLN2A monocíclica con Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B lineal y Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B; procedimiento general:

La RLN1A o RLN2A lineal monocíclica humana desprotegida (0,006 mmol) y Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B o Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de glicinato de sodio / clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10, 5. Después se añadió 1 ml de DMS durante un periodo de 12 horas y la mezcla se agitó a 15 °C otras 4 horas. De la disolución resultante se aisló, tras purificación, la Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B o Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B, como se describe en el ejemplo 4.

Los rendimientos en tres ejecuciones tuvieron un promedio de: B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 32 % y B-Met<sup>25</sup>(O)-RLN2 36 %.

#### Ejemplo 12

Síntesis de B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 y B-Met<sup>25</sup>(O)-RLN2 humana, combinando RLN1A o RLN2A monocíclica con Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B y Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B cíclica; procedimiento general.

La RLN1A o RLN2A monocíclica humana desprotegida (0,006 mmol) y Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B o Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B cíclica (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de glicinato de sodio/clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10, 5. Después se añadió 1 ml de DMS durante un periodo de 12 horas y la mezcla se agitó a 15 °C otras 4 horas. De la disolución resultante se aisló, tras purificación, la Met<sup>24</sup>(O)-RLN1B o Met<sup>25</sup>(O)-RLN2B, como se describe en el ejemplo 4.

Los rendimientos en tres ejecuciones tuvieron un promedio de: B-Met<sup>24</sup>(O)-RLN1 35 % y B-Met<sup>25</sup>(O)-RLN2 38 %.

Ejemplo 13

Síntesis de Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 humana combinando la RLN1 bicíclica y la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B lineal y síntesis de Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 humana combinando la RLN2 bicíclica y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B lineal; procedimiento general: (Figura 16).

La RLN1A bicíclica desprotegida (0,005 mmol) y la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B Met(O)<sup>25</sup> lineal (0,005 mmol) se disolvieron en 4 ml de tampón de glicinato de sodio / clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10, 5 y se agitó durante una hora a 15 °C. Después se añadió 1 ml de DMSO durante un periodo de 12 horas y la mezcla se agitó a 24 °C durante 4 horas más. De la solución resultante se aisló, tras purificación, la Met(O)<sup>25</sup>-RLN1, usando el método descrito en el ejemplo 4. El procedimiento se repitió para producir Met(O)<sup>25</sup>-RLN2 combinando la RLN2 bicíclica y la Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B lineal. Los rendimientos de tres purificaciones tuvieron un promedio de: B-Met(O)<sup>25</sup>-RLN1 64 % y B-Met(O)<sup>24</sup>-RLN2 76 %, basado en la cadena B aplicada.

Ejemplo 14

Síntesis de B-Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 humana combinando la RLN1A bicíclica y Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B cíclica y síntesis de B-Met(O)<sup>25</sup>RLN2 combinando la RLN2A bicíclica y Met(O)<sup>25</sup>RLN2B cíclica; procedimiento general (Figura 17).

La RLN1A bicíclica desprotegida (0,011 mmol) y la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1B o Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica (0,01 mmol) se disolvieron en 15 ml de tampón de glicinato de sodio / clorhidrato de 6-N guanidinio (4:1) a un pH de 10, 5. Después, se añadió una disolución de tiofenol 0,001 mmol en 3 ml de THF y la mezcla se agitó a 15 °C durante 24 horas. De la disolución resultante se aisló, tras purificación, la Met(O)<sup>24</sup>-RLN1 o Met(O)<sup>25</sup>-RLN2, usando el método descrito en el ejemplo 4. El procedimiento se repitió para producir Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B de RLN2A bicíclica y de Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica. Los rendimientos de tres purificaciones tuvieron un promedio de: B-Met(O)<sup>24</sup>RLN1 68 %, B-Met(O)<sup>25</sup>RLN2 72 %, basado en la cadena B aplicada.

Ejemplo 15

Síntesis de RLX1, RLX2, RLX1B, RLX2B, RLX1B cíclica y RLX2B cíclica humana mediante la reducción de BMet(O)<sup>24</sup>RLX1, B-Met(O)<sup>25</sup>RLX2, Met(O)<sup>24</sup>RLX1B, Met(O)<sup>25</sup>RLX2B, Met(O)<sup>24</sup>RLX1B cíclica y Met(O)<sup>25</sup>RLX2B cíclica, respectivamente con yoduro de amonio, procedimiento general.

Este procedimiento se efectuó con cada uno de los análogos peptídicos o proteicos de RLN1, RLN2, RLN1B, RLN2B, RLN1B cíclica y RLN2B cíclica que contenían Met(O). Se disolvieron 0,01 mmol de análogo de Met(O) en 25 ml de TFA-90 % en agua. Después se añadió 1 mmol de yoduro de amonio y la mezcla se agitó a 24 °C durante 15 min. De la solución resultante se aisló, tras purificación, el producto deseado (RLN1, RLN2, RLN1B, RLN2B, RLN1B cíclica, RLN2B cíclica) por HPLC, usando el método descrito en el ejemplo 4. Los rendimientos de tres purificaciones tuvieron un promedio de: RLN1 91 %, RLN2 89 %, RLN1B 62 %, RLN2B 64 %, RLN1B cíclica 88 % y RLN2B cíclica 81 %.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la producción de un péptido similar a la insulina que tiene al menos dos cadenas peptídicas, A y B, estando unidas la cadena A y la cadena B por al menos un puente disulfuro, cuyo proceso comprende:
- 5 proporcionar una cadena peptídica A totalmente desprotegida y una cadena B totalmente desprotegida, conteniendo cada cadena al menos un resto de cisteína y teniendo cada cadena, opcionalmente, un puente disulfuro intramolecular, y conteniendo la cadena B un resto de metionina oxidado;
- 10 combinar la cadena A totalmente desprotegida y la cadena B totalmente desprotegida en condiciones tales que se forme al menos un puente disulfuro intramolecular para unir la cadena A y la cadena B;
- y
- reducir el resto de metionina oxidado para producir el péptido similar a la insulina.
2. El proceso según la reivindicación 1, en el que el péptido similar a la insulina es una relaxina.
3. El proceso según la reivindicación 2, en el que la relaxina es relaxina 1 o relaxina 2 y la cadena A es una cadena A de relaxina y la cadena B es una cadena B de relaxina y en el que en combinación con la cadena A:
- 20 al menos una proporción de la cadena B no tiene un puente disulfuro intramolecular; o está presente un agente reductor para reducir un puente disulfuro intramolecular de la cadena B.
4. El proceso según la reivindicación 3, en el que está presente un agente reductor y el agente reductor se selecciona de la cadena A que tiene un resto de cisteína libre y la cadena B que tiene un resto de cisteína libre.
5. El proceso según la reivindicación 4, en el que el agente reductor comprende la cadena B que tiene un resto de cisteína libre.
6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cadena B tiene un grupo de cisteína libre y la cadena A tiene un puente disulfuro intramolecular.
7. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido es una relaxina seleccionada de relaxina 1 y relaxina 2 y la cadena A tiene dos puentes disulfuro intramoleculares y al menos una proporción de la cadena B no tiene un puente disulfuro intramolecular.
8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la relaxina es relaxina humana 1 y la cadena B es Met(O)<sup>24</sup>RLN1B o relaxina humana 2 y la cadena B es Met(O)<sup>25</sup>RLN2B.
9. Un proceso según la reivindicación 2, en el que la cadena A totalmente desprotegida tiene al menos un enlace disulfuro intramolecular.
10. Un proceso para la producción de un péptido similar a la insulina que tiene al menos dos cadenas peptídicas, A y B, estando unidas la cadena A y B por al menos un puente disulfuro y teniendo la cadena B al menos un resto de metionina oxidado cuyo proceso comprende:
- 45 proporcionar una cadena peptídica A totalmente desprotegida y una cadena B totalmente desprotegida, conteniendo cada cadena al menos un resto de cisteína y conteniendo la cadena B un resto de metionina oxidado;
- 50 combinar la cadena A totalmente desprotegida y la cadena B totalmente desprotegida en condiciones tales que al menos un resto de cisteína en la cadena A y al menos un resto de cisteína en la cadena B se combinen para unir las cadenas entre sí, para producir el péptido similar a la insulina que tiene un resto de metionina oxidado.
11. El proceso según la reivindicación 10, en el que el péptido similar a la insulina es un óxido de metionina que contiene relaxina y se produce combinando:
- 55 la cadena A de relaxina lineal totalmente desprotegida y la cadena B de relaxina lineal totalmente desprotegida; la cadena A de relaxina lineal totalmente desprotegida y una cadena B de relaxina cíclica totalmente desprotegida; o una cadena A de relaxina monocíclica totalmente desprotegida o bicíclica totalmente desprotegida y una cadena B de relaxina lineal totalmente desprotegida; y
- 60 oxidando el producto resultante.
12. El proceso según la reivindicación 11, en el que la oxidación se lleva a cabo usando DMSO, aire o peróxido de hidrógeno.
13. El proceso según la reivindicación 10, en el que el péptido similar a la insulina es un óxido de metionina que contiene relaxina y se produce combinando, en presencia de un agente reductor, la cadena A de relaxina

monocíclica totalmente desprotegida o bicíclica totalmente desprotegida y la cadena B de relaxina cíclica totalmente desprotegida.

5 14. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 10, en el que el resto de óxido de metionina se introduce utilizando un derivado de óxido de metionina protegido con N o se añade un resto de metionina a la cadena peptídica y después se oxida en un resto de óxido de metionina.

10 15. Una relaxina humana sintética, totalmente desprotegida, biológicamente activa, que contiene uno o dos restos de sulfóxido de metionina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como medicamento.

16. La relaxina humana sintética para su uso según la reivindicación 15, en la que el medicamento es para su uso en uno o más de lo siguiente: el tratamiento de una afección cardíaca, fibrosis, respuesta alérgica, cáncer, cicatrización y el tratamiento de afecciones que requieren un control de la renovación de colágeno.

15 17. La relaxina humana sintética, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, seleccionada de:

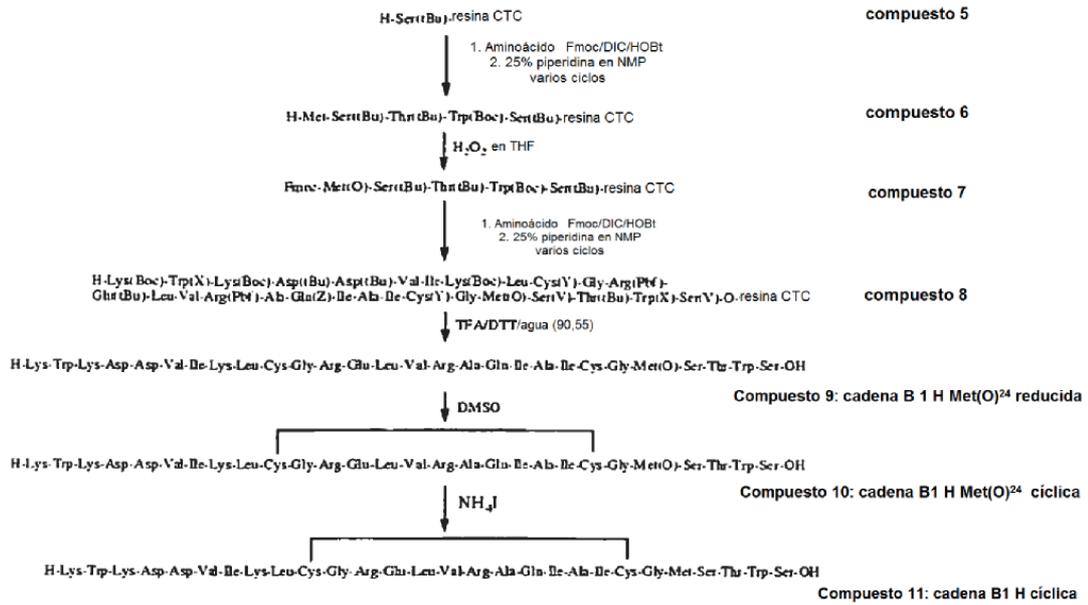
- 20 i) relaxina 1 Met(O)<sup>24</sup> humana que tiene una secuencia como se ilustra en la Figura 3;  
ii) relaxina 2 Met(O)<sup>25</sup> humana que tiene una secuencia como se ilustra en la Figura 4; y  
iii) una sal farmacéuticamente aceptable de i) o ii).

25 18. Una composición farmacéutica que comprende una relaxina humana sintética totalmente desprotegida, biológicamente activa, que contiene uno o dos restos de sulfóxido de metionina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Una composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que la relaxina sintética se selecciona de:

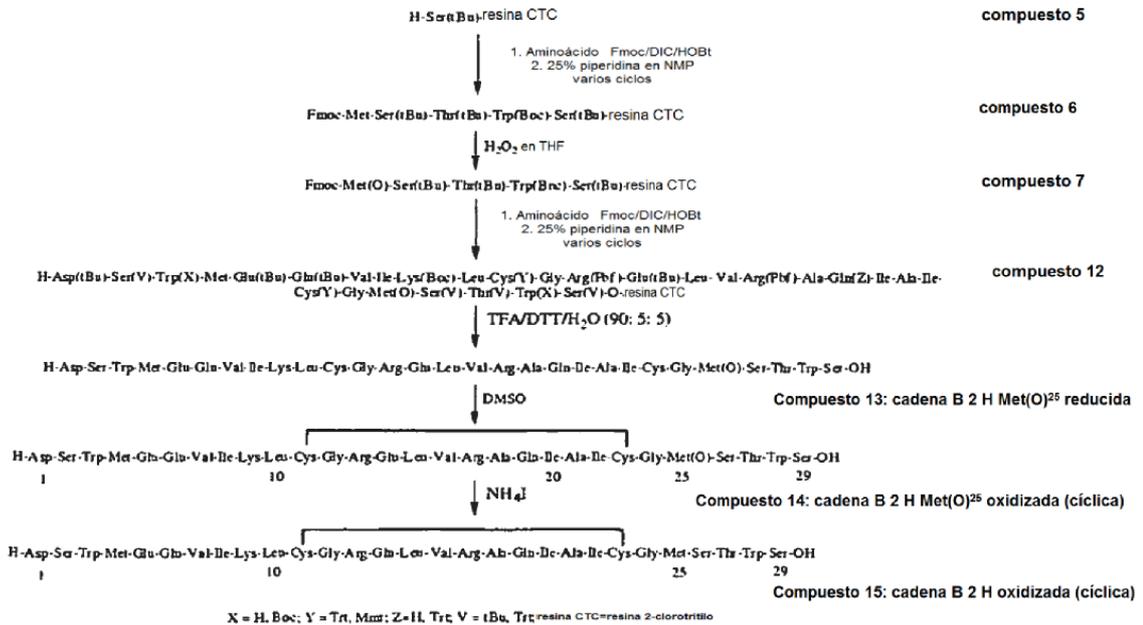
- 30 i) relaxina 1 Met(O)<sup>24</sup> humana que tiene una secuencia como se ilustra en la Figura 3;  
ii) relaxina 2 Met(O)<sup>25</sup> humana que tiene una secuencia como se ilustra en la Figura 4; y  
iii) una sal farmacéuticamente aceptable de i) o ii).





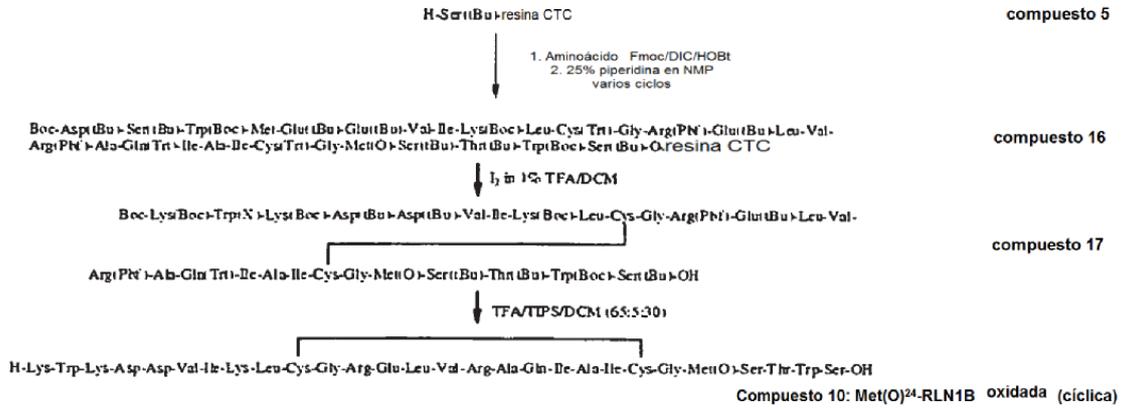
X = H, Boc; Y = Trt, Mmt; Z = H, Trt; V = tBu, Trt; resina CTC = resina 2-clorotribilo

Figura 5. Oxidación con DMSO: Síntesis de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> reducida (lineal) [compuesto 9, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B], de la cadena B de relaxina 1 humana Met(O)<sup>24</sup> oxidada (ciclica) [compuesto 10, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B] y de la cadena B de relaxina 1 humana oxidada (ciclica) [compuesto 11, shRLN1B]



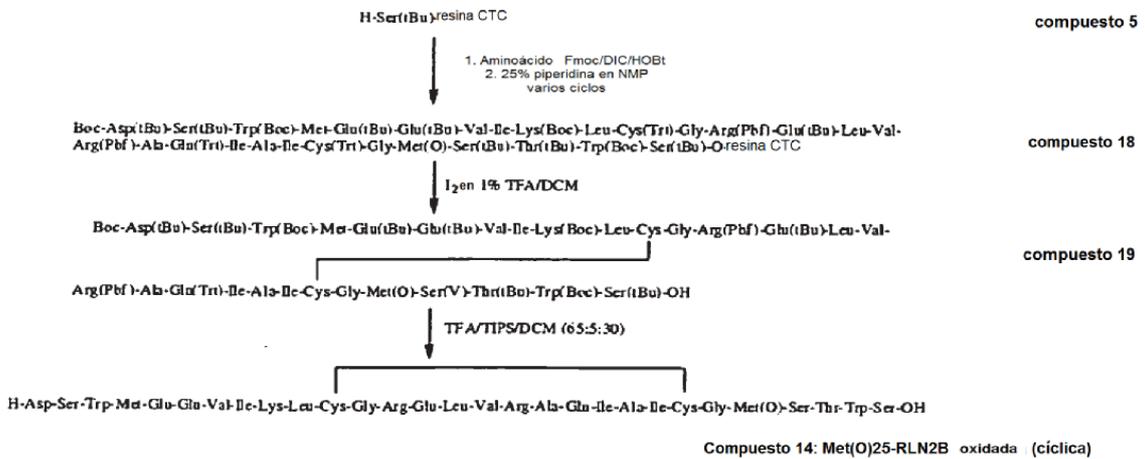
X = H, Boc; Y = Trt, Mmt; Z = H, Trt; V = tBu, Trt; resina CTC = resina 2-clorotribilo

Figura 6. Oxidación con DMSO: Síntesis de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> reducida (lineal) [compuesto 13, Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B], de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> oxidada (ciclica) [compuesto 14, Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B] y de la cadena B de relaxina 2 humana oxidada (ciclica) [compuesto 15, shRLN2B]



X = H, Boc; V = (Bu, Trt); Resina resina CTC=resina 2-clorotritilo ; TIPS=triisopropilsilano

Figura 7. Oxidación con yodo: Síntesis de la cadena B de relaxina 1 human Met(O)<sup>24</sup> oxidada (cíclica) [compuesto 10, Met(O)<sup>24</sup>-shRLN1B]



resina CTC=resina 2-clorotritilo ; TIPS=triisopropilsilano

Figura 8. Síntesis de la cadena B de relaxina 2 humana Met(O)<sup>25</sup> oxidada (cíclica) [Met(O)<sup>25</sup>-shRLN2B]

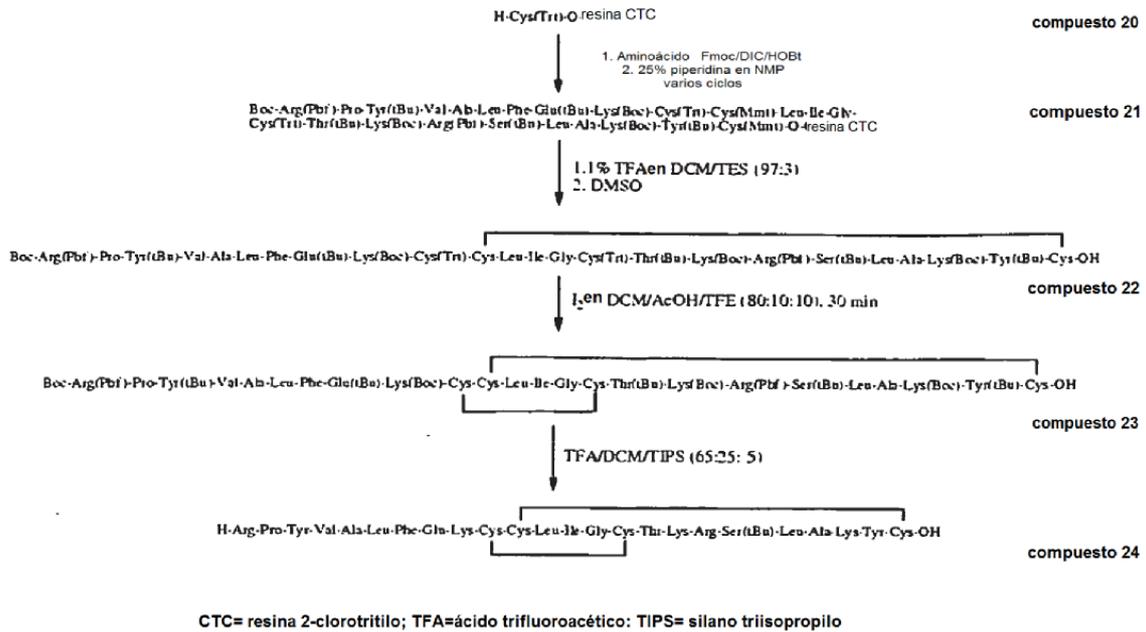


Figura 9. Síntesis de RLN1A bicíclica [compuesto 24] con la aplicación de los grupos protectores S-Mmt y Trt

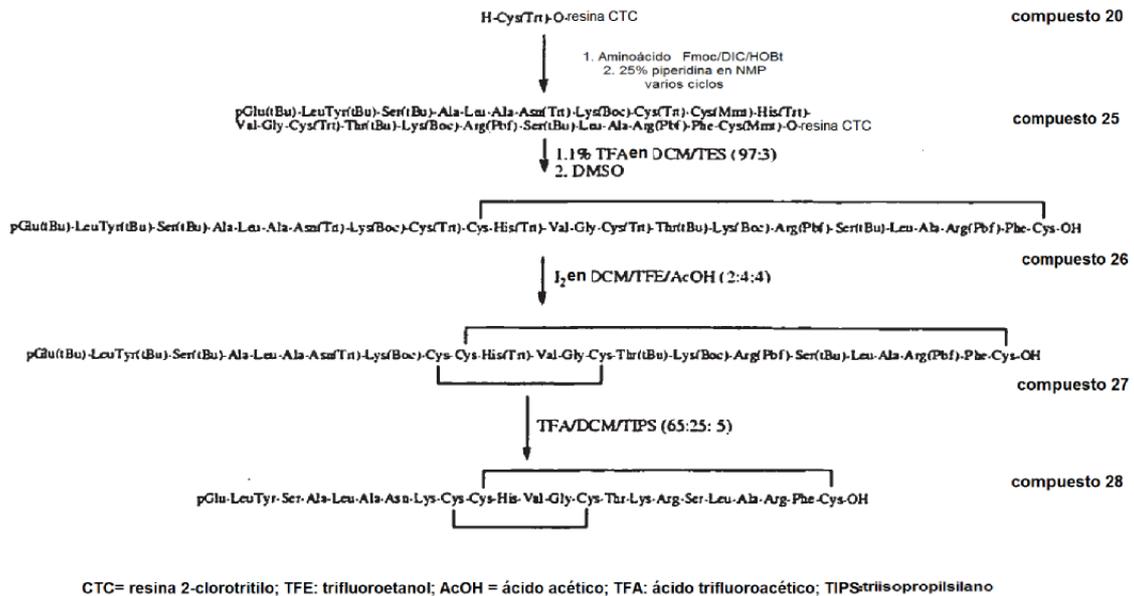
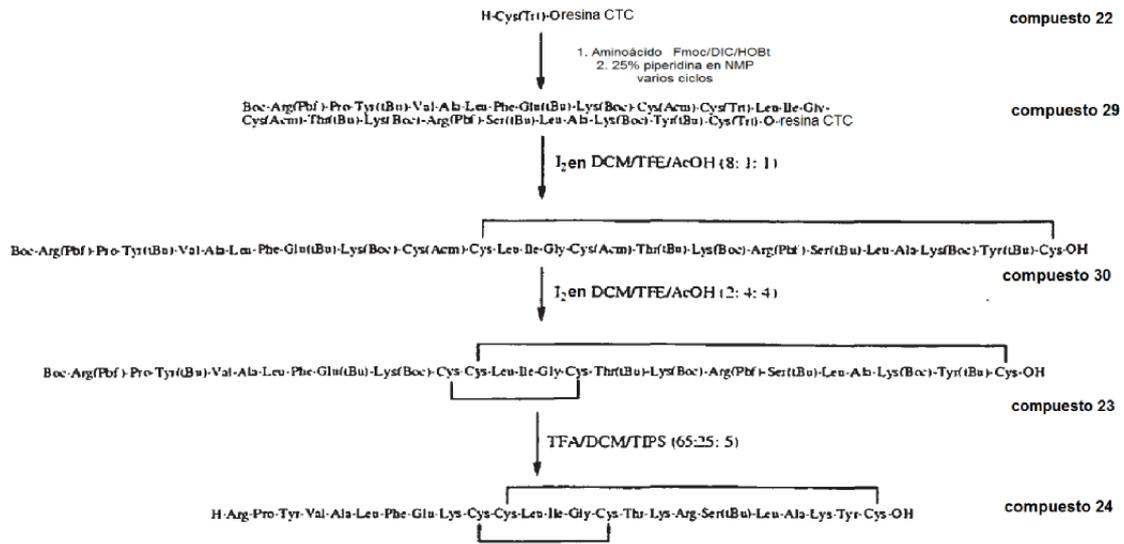
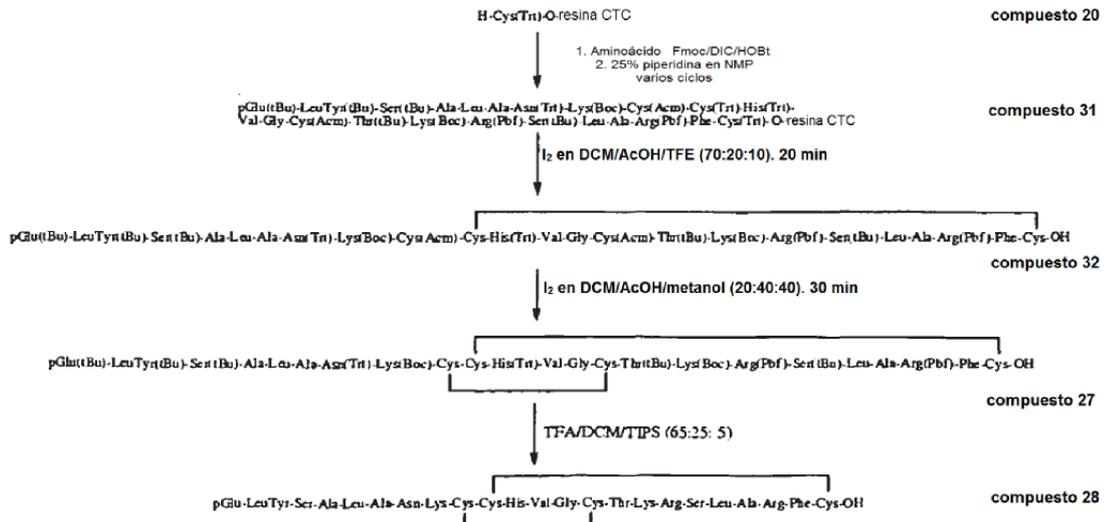


Figura 10. Síntesis de la cadena A de relaxina 2 humana bicíclica [compuesto 28:RLN2A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Mmt y Trt.



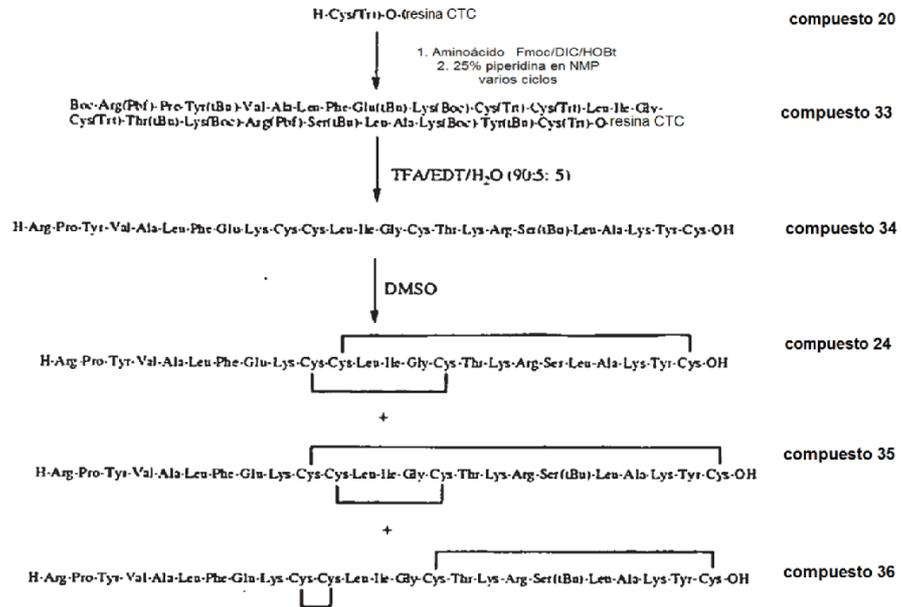
CTC= resina 2-clorotritilo; TFE: trifluoroetanol; AcOH = ácido acético; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsilano

Figura 11. Síntesis de la cadena A de relaxina humana 1 bicíclica [cadena RLN1A: compuesto 24; RLN1A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Acm y Trt

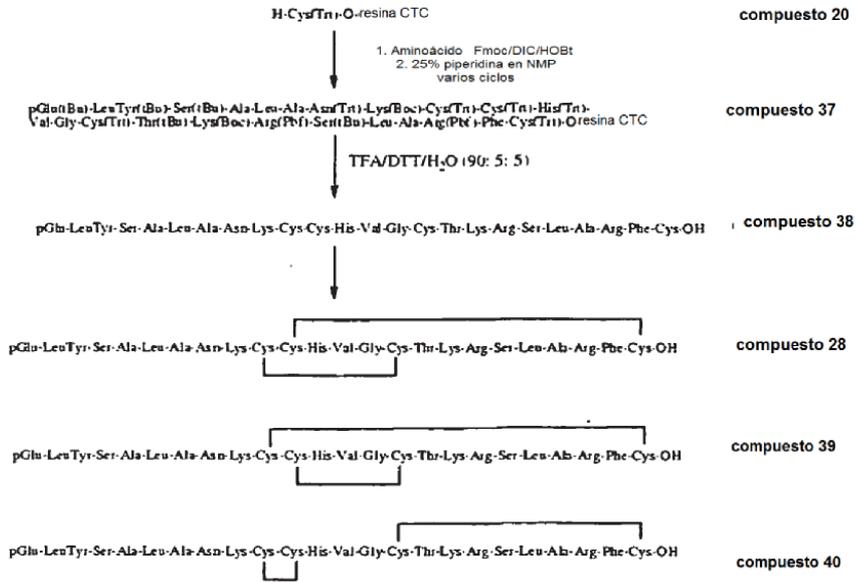


CTC= resina 2-clorotritilo; TFE: trifluoroetanol; AcOH = ácido acético; TFA: ácido trifluoroacético; TIPS: triisopropilsilano

Figura 12. Síntesis de la cadena A de relaxina 2 humana bicíclica [compuesto 19; RLN2A bicíclica] con la aplicación de los grupos protectores S-Acm y Trt

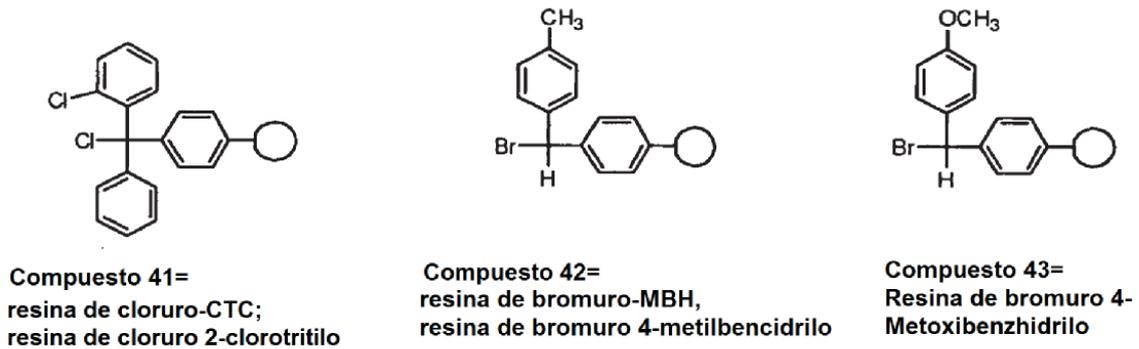


CTC= resina 2-clorotritilo; TFA=ácido trifluoroacético; EDT: ditiotretol  
 Figura 13. Síntesis de una mezcla de la cadena A de relaxina 1 humana sintética bicíclica [compuestos 24, 35-36; RLN1A bicíclica] mediante oxidación con DMSO de la cadena lineal



CTC= resina 2-clorotritilo; TFA=ácido trifluoroacético; EDT:ditiotreitolo

Figura 14. Síntesis de una mezcla de la cadena A de relaxina 2 humana sintética bicíclica (compuesto 28, 39-40; RLN2A bicíclica) mediante la oxidación con DMSO de la cadena lineal



○ = poliestireno reticulado con divinilbenceno

Figura 15. Ejemplos de resinas del tipo tritilo y bencidrílo usadas para la síntesis de las cadenas de RLN A y B

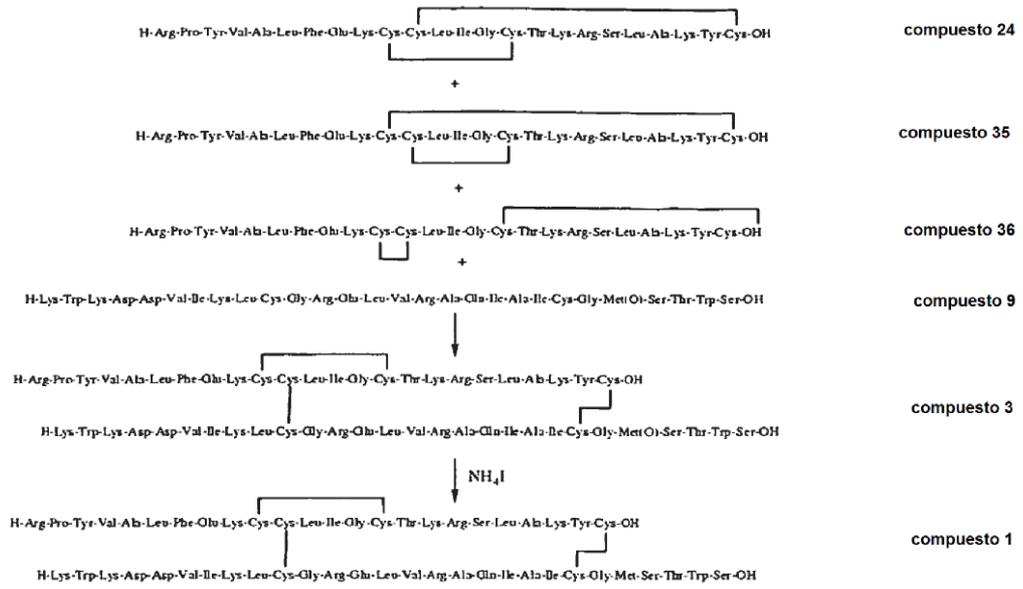


Figura 16. Síntesis de Met(O)<sup>24</sup> relaxina 1 [Met(O)<sup>24</sup>-RLN1: compuesto 3] y de la relaxina 1 [RLN1: compuesto 1] mediante la combinación de cadenas RLN1A bicíclica y RLN1B reducida

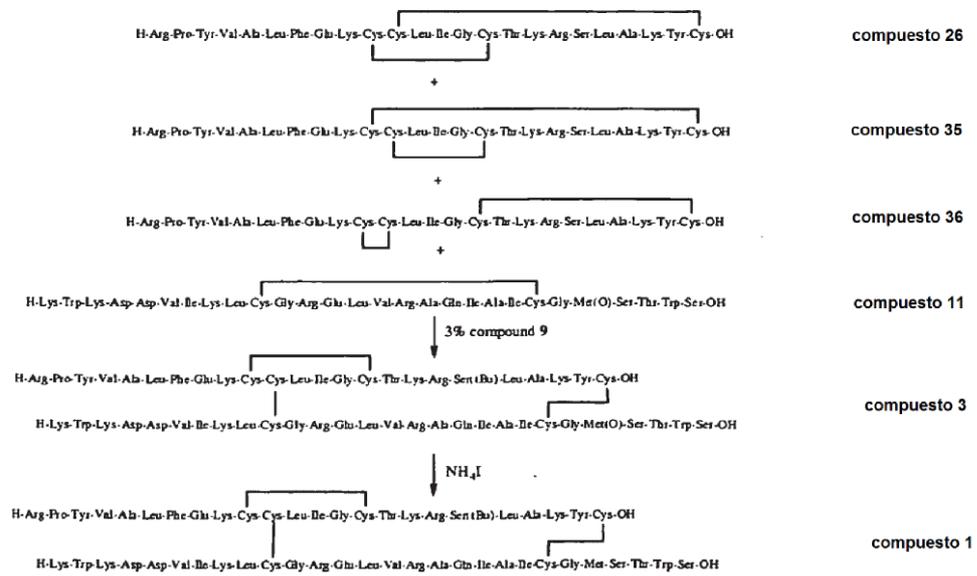


Figura 17. Síntesis de Met(O)<sup>24</sup> relaxina 1 [Met(O)<sup>24</sup>-RLN1] y de la relaxina 1 [RLN1] mediante la combinación de las cadenas RLN1A bicíclica y RLN1B cíclica



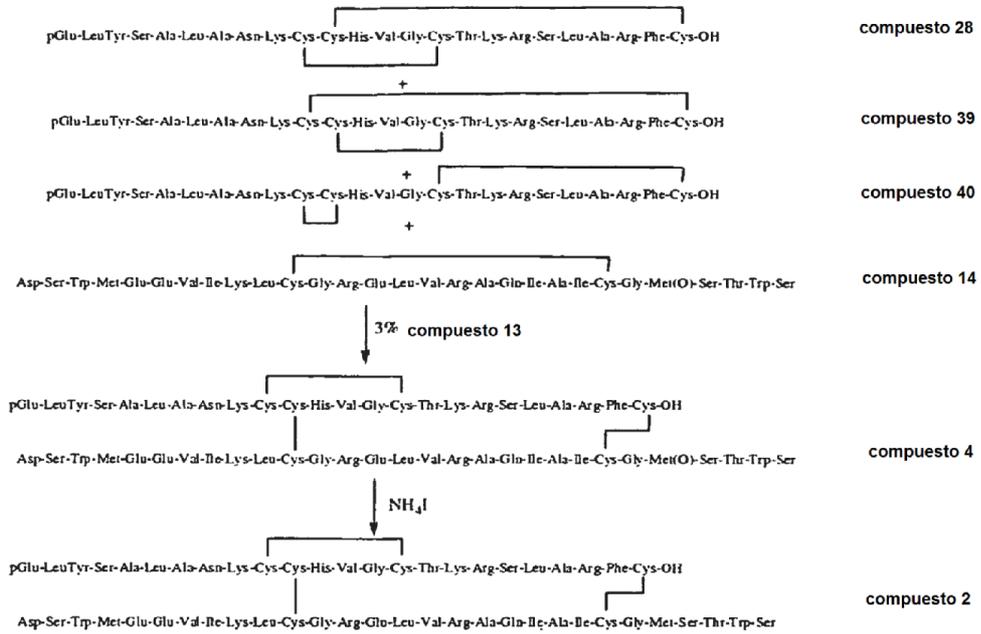


Figura 19. Síntesis de la relaxina 2 humana [RLN2; compuesto 2] y Met(O)<sup>25</sup> relaxina humana 2 [Met(O)<sup>25</sup>-RLN2; compuesto 4] mediante la combinación de las cadenas RLN2A bicíclica y Met(O)<sup>25</sup>-RLN2B cíclica