

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 647**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/JP2014/051357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14115797**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14743069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2949665**

54 Título: **Péptido natriurético auricular glicosilado**

30 Prioridad:

23.01.2013 JP 2013010612

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

26.04.2018

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**IWAMOTO, MITSUHIRO;
YAMAGUCHI, TAKAHIRO;
MORI, YUTAKA;
SAITO, KEIJI;
HONDA, TAKESHI y
NAGAYAMA, TAKAHIRO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 665 647 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

Péptido natriurético auricular glicosilado

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un péptido natriurético auricular modificado con glúcidos que tiene una conexión de cadena glucídica y exhibe un tiempo de duración mejorado en sangre, a un medicamento que comprende el péptido modificado como principio activo, etc.

Antecedentes en la técnica

10 Los péptidos natriuréticos auriculares son péptidos biológicamente activos que tienen un efecto vasodilatador, un efecto diurético, un efecto inhibidor del crecimiento celular, un efecto de disminución del retorno venoso, y un efecto inhibidor de la actividad simpática. El hANP nativo pierde su actividad tras escisión mediante endopeptidasa neutra (NEP) en la sangre y por lo tanto tiene una semivida corta en sangre. Por tales razones, el hANP nativo necesita administrarse continuamente mediante infusión por goteo o similar en la práctica clínica actual.

15 Algunos ejemplos de intentos para prolongar las semividas en sangre de tales péptidos biológicamente activos que tienen una semivida corta en sangre incluyen diversos procedimientos tales como la utilización de formulaciones de liberación sostenida, sustitución o modificación de aminoácidos, péptidos de fusión que contienen albúmina conectada, una porción Fc de inmunoglobulina, o similar, y péptidos modificados que contienen un polímero añadido (por ejemplo, PEG). Cuando se aplican los péptidos biológicamente activos a medicamentos por razones de su actividad biológica, se requiere prolongar sus semividas en sangre mientras se mantiene la actividad biológica poseída por el péptido a niveles farmacológicamente necesarios. Se han realizado intentos para aplicar tales péptidos biológicamente activos que tienen una semivida prolongada en sangre a medicamentos en numerosos péptidos.

20 La Referencia de No Patente 1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 12544-12548) y la Referencia de No Patente 2 (Bioconjugate Chem. 2008, 19, 342-348) desvelan un péptido modificado en el que está unido PEG a un péptido natriurético auricular (ANP).

25 La Referencia de Patente 1 (documento de Patente WO2006/076471 A2) desvela un péptido modificado en el que está unido PEG a un péptido natriurético cerebral (BNP).

La Referencia de Patente 2 (documento de Patente WO2008/154226 A1) y la Referencia de No Patente 3 (Bioconjugate Chem. 2012, 23, 518-526) describen una proteína de fusión en la que un fragmento Fc de inmunoglobulina está unido a ANP.

30 La Referencia de Patente 3 (documento de Patente WO2004/047871 (A2,A3) y la Referencia de Patente 4 (documento de Patente WO2009/142307 A1) desvelan un mutante que tiene una secuencia de aminoácidos alterada de ANP.

35 Sin embargo, estas técnicas no siempre tienen éxito. En particular, no es posible predecir si se pueden obtener a la vez un tiempo de duración suficiente en sangre y un mantenimiento de la actividad necesaria para efectos farmacológicos, a menos que se realicen realmente un gran número de ensayos.

Lista de citas

Referencias de Patente

40 Referencia de Patente 1: Publicación Internacional n.º WO2006/076471
Referencia de Patente 2: Publicación Internacional n.º WO2008/154226
Referencia de Patente 3: Publicación Internacional n.º WO2004/047871
Referencia de Patente 4: Publicación Internacional n.º WO2009/142307

Referencias de No Patente

45 Referencia de No Patente 1: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 12544-12548
Referencia de No Patente 2: Bioconjugate Chem. 2008, 19, 342-348)
Referencia de No Patente 3: Bioconjugate Chem. 2012, 23, 518-526

Sumario de la invención

Problema técnico

50 Un objeto de la presente invención es descubrir un péptido modificado que exhiba un tiempo de duración prolongado en sangre en comparación con un péptido natriurético auricular humano (hANP) nativo y mantenga la actividad de elevación de GMPc.

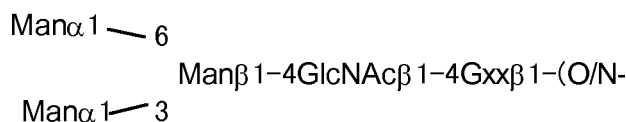
Solución al problema

Los presentes inventores han realizado estudios diligentes en la modificación de hANP de un modo tal que se prolongue el tiempo de duración en sangre y se mantenga la actividad de elevación de GMPc. Como resultado, los presentes inventores han completado la presente invención mediante el descubrimiento, por ejemplo, que los péptidos modificados, en los que una cadena glucídica está unida a hANP mediante diversos procedimientos, elevaron la concentración de GMPc intracelular de las células que expresan receptores GC-A, exhibieron un tiempo de duración prolongado en sangre cuando se administraron a ratones y elevaron persistentemente la concentración de GMPc en sangre incluso 60 minutos o más después de la administración del péptido modificado.

La presente invención proporciona lo siguiente:

- (1) Un péptido modificado en el que al menos una sustancia de azúcar está conectada directamente a través de un enlace glucosídico o a través de una estructura conectora al menos a un péptido hANP, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- (2) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar que está conectada directamente a través de un enlace glucosídico o a través de una estructura conectora al menos a uno del extremo N-terminal del péptido hANP, el extremo C-terminal del péptido hANP, y la cadena lateral de al menos un aminoácido que constituye el péptido.
- (3) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido hANP es hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).
- (4) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar se selecciona entre al menos un tipo de monosacárido, disacárido, trisacárido, y cadena glucídica de 4 o más monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos, y cuando una pluralidad de sustancias de azúcar están contenidas en una molécula, las sustancias de azúcar pueden ser iguales o diferentes entre sí.
- (5) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica de 4 o más monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos.
- (6) El péptido modificado de acuerdo con (5) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica N-conectada o una cadena glucídica O-conectada derivada de glucoproteína, o una cadena glucídica alterada de la misma.
- (7) El péptido modificado de acuerdo con (6) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica N-conectada que comprende una estructura de cadena glucídica representada por la siguiente fórmula, o una cadena glucídica alterada en el extremo reductor de la misma:

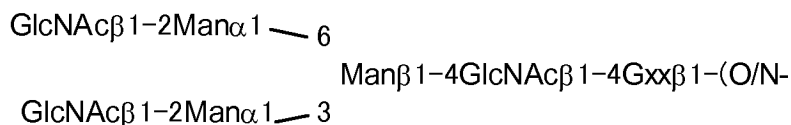
[Fórmula 1]



en la que Gxx es GlcNAc, Glc, o Man (en lo sucesivo en el presente documento, las cadenas glucídicas que tienen la estructura anterior se denominan "AG(5)", "AG(5-Glc)", y "AG(5-Man)", respectivamente, de acuerdo con el tipo de Gxx), y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora o el péptido hANP a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico.

(8) El péptido modificado de acuerdo con (7) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica que comprende una estructura de cadena glucídica representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]

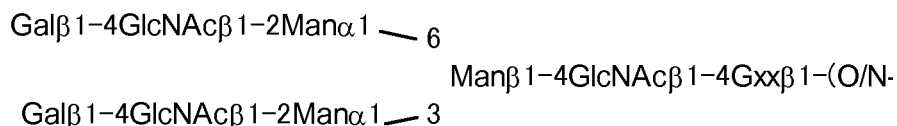


en la que Gxx es GlcNAc, Glc, o Man (en lo sucesivo en el presente documento, las cadenas glucídicas que tienen la estructura anterior se denominan "AG(7)", "AG(7-Glc)", y "AG(7-Man)", respectivamente, de acuerdo con el tipo de Gxx), y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora o el péptido hANP a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico.

(9) El péptido modificado de acuerdo con (8) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica que comprende una estructura de cadena glucídica representada

por la siguiente fórmula:

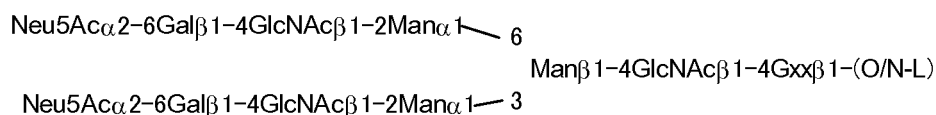
[Fórmula 3]



en la que Gxx es GlcNAc, Glc, o Man (en lo sucesivo en el presente documento, las cadenas glucídicas que tienen la estructura anterior se denominan "AG(9)", "AG(9-Glc)", y "AG(9-Man)", respectivamente, de acuerdo con el tipo de Gxx), y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora o el péptido hANP a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico.

(10) El péptido modificado de acuerdo con (9) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es una cadena glucídica que comprende una estructura de cadena glucídica representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 4]



en la que Gxx es GlcNAc, Glc, o Man (en lo sucesivo en el presente documento, las cadenas glucídicas que tienen la estructura anterior se denominan "SG", "SG(Glc)", y "SG(Man)", respectivamente, de acuerdo con el tipo de Gxx), y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora o el péptido hANP a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico.

(11) El péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (7) a (10) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que en la sustancia de azúcar, Gxx es GlcNAc.

(12) El péptido modificado de acuerdo con (11) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar es SG.

(13) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que están conectadas 10 o menos sustancias de azúcar a un péptido hANP.

(14) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que están conectadas 1, 2 o 3 sustancias de azúcar a un péptido hANP,

(15) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que cada molécula del péptido modificado contiene un péptido hANP divalente o superior.

(16) El péptido modificado de acuerdo con (3) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar está conectada a través de una estructura conectora al péptido hANP, y la estructura conectora es una estructura química que tiene una cadena de conexión de 3 o más átomos y está unida al menos a un sitio al extremo reductor de la sustancia de azúcar a través de un enlace glucosídico y está unida al menos a un sitio al péptido hANP.

(17) El péptido modificado de acuerdo con (16) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar está conectada a cualquiera del extremo N-terminal o el extremo C-terminal, o ambos, del péptido hANP a través de una estructura conectora.

(18) El péptido modificado de acuerdo con (17) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora es una estructura que tiene una cadena de conexión de 15 o menos átomos.

(19) El péptido modificado de acuerdo con (18) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1), hANP(1-28)-SG (compuesto 2-2), SG-hANP(1-28)-SG (compuesto 2-7), AG(9)-hANP(1-28) (compuesto 2-10), SG-triazol-hANP(1-28) (compuesto 2-12), SG-tioacetamida-hANP(1-28) (compuesto 2-25), o AG(5)-hANP(1-28) (compuesto 2-26), o se obtiene a partir de cualquiera de estos péptidos modificados mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

(20) El péptido modificado de acuerdo con (16) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos una estructura seleccionada entre una cadena de polioxialquileno, un aminoácido, y una cadena de oligopéptido que consiste en 2 o más aminoácidos.

(21) El péptido modificado de acuerdo con (20) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la cadena de polioxialquileno, el aminoácido, y/o la cadena de oligopéptido contenidos en la estructura conectora están unidos a través de un enlace amida al extremo que N-terminal y/o el extremo C-terminal del péptido hANP.

(22) El péptido modificado de acuerdo con (21) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la

cadena de polioialquileo es PEG.

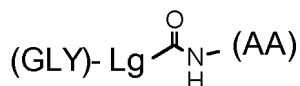
(23) El péptido modificado de acuerdo con (21) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-16), AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-21), AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-22), SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (compuesto 2-24), SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-27), SG-(SG-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-28), SG-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-29), SG-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-30), SG-(SG-)Gln-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-31), SG-(SG-)Gln-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (compuesto 2-32), SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)3-hANP(1-28) (compuesto 2-36), o SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto 2-37), o

se obtiene a partir de cualquiera de estos péptidos modificados mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

(24) El péptido modificado de acuerdo con (20) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene un grupo funcional en la cadena lateral seleccionado entre un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral, un aminoácido que tiene SH en la cadena lateral, un aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral, un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral, y un aminoácido que tiene fenol en la cadena lateral y está conectado en la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo funcional en la cadena lateral de la sustancia de azúcar o el péptido hANP.

(25) El péptido modificado de acuerdo con (24) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral y tiene una estructura de la siguiente fórmula general (C) en la que la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral:

[Fórmula 5]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y N-(AA) representa un átomo de nitrógeno obtenido a partir del grupo amino de la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral.

(26) El péptido modificado de acuerdo con (25) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el grupo amino de la cadena lateral y el grupo amino α del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral forman enlaces amida con los grupos carboxilo α de otros aminoácidos.

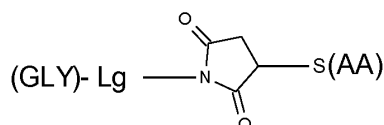
(27) El péptido modificado de acuerdo con (25) o (26) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral es Lys.

(28) El péptido modificado de acuerdo con (27) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (compuesto 2-14), [(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (compuesto 2-15), SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-19), [SG₂-Mal-(SG₂-Mal-)Lys-[SG₂-Mal-(SG₂-Mal-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-20), SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-hANP(1-28) (compuesto 2-33), SG-tioacetamida-(SG-tioacetamida-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-34), o SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-35), o

se obtiene a partir de cualquiera de estos péptidos modificados mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

(29) El péptido modificado de acuerdo con (24) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral y tiene una estructura de la siguiente fórmula general en la que la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral:

[Fórmula 6]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y S representa un átomo de azufre que deriva del grupo SH de cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral.

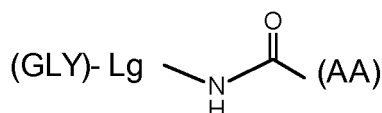
(30) El péptido modificado de acuerdo con (29) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral es Cys.

(31) El péptido modificado de acuerdo con (30) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-17), [(SG₂-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-18), o SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-23), o

se obtiene a partir de cualquiera de estos péptidos modificados mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

(32) El péptido modificado de acuerdo con (24) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral y tiene una estructura de la siguiente fórmula general en la que la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene ácido carboxílico en la cadena lateral:

[Fórmula 7]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y CO representa CO que deriva de la cadena lateral del aminoácido que tiene ácido carboxílico en la cadena lateral.

(33) El péptido modificado de acuerdo con (32) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar está unida a través de un enlace N-glucosídico a ambos del grupo carboxilo de cadena lateral y el grupo carboxilo α del aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral y está unida a otra estructura conectora o al péptido hANP a través del grupo amino α.

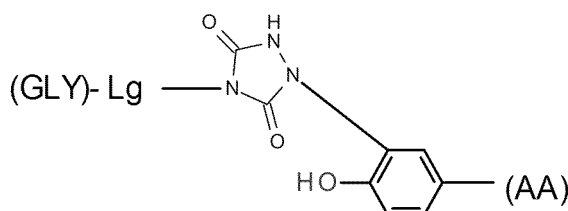
(34) El péptido modificado de acuerdo con (32) o (33) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral es Glu, Gln, Asp, o Asn.

(35) El péptido modificado de acuerdo con (34) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es (SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-3), (SG-)Asn-hANP(2-28) (compuesto 2-4), (SG-)Asn-hANP(3-28) (compuesto 2-8), SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-9), o SG-(SG-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-13), o

se obtiene a partir de cualquiera de estos péptidos modificados mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

(36) El péptido modificado de acuerdo con (24) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene fenol en la cadena lateral y tiene una estructura de la siguiente fórmula general en la que la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene fenol en la cadena lateral:

[Fórmula 8]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de

extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y el grupo fenol representa un grupo fenol que deriva de la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo fenol en la cadena lateral.

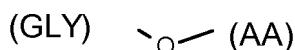
(37) El péptido modificado de acuerdo con (36) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el aminoácido que tiene un grupo fenol en la cadena lateral es Tyr.

5 (38) El péptido modificado de acuerdo con (37) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es hANP(1-27)-(SG-)Tyr (compuesto 2-6), o

se obtiene a partir del péptido modificado mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

10 (39) El péptido modificado de acuerdo con (24) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la estructura conectora comprende al menos un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral y tiene una estructura de la siguiente fórmula general en la que la sustancia de azúcar está unida a través de un enlace O-glucosídico a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral:

[Fórmula 9]



15 en la que GLY representa la sustancia de azúcar; y O representa un átomo de oxígeno que deriva del grupo hidroxilo de cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral.

(40) El péptido modificado de acuerdo con (39) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral es Ser.

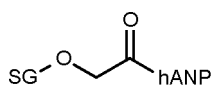
20 (41) El péptido modificado de acuerdo con (40) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado es (SG-)Ser-hANP(2-28) (compuesto 2-5), o

se obtiene a partir del péptido modificado mediante el reemplazo de la sustancia de azúcar con SG, SG(Glc), SG(Man), AG(5), AG(5-Glc), AG(5-Man), AG(7), AG(7-Glc), AG(7-Man), AG(9), AG(9-Glc), AG(9-Man), o GlcNAc y/o el reemplazo del péptido hANP con hANP(1-28), hANP(2-28), hANP(3-28), hANP(1-27), hANP(2-27), o hANP(3-27).

25 (42) El péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (16) a (41) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado tiene una o dos moléculas de SG como la sustancia de azúcar y un hANP(1-28) (SEQ ID NO: 1) como el péptido hANP, y la SG está conectada al extremo N-terminal del hANP(1-28) a través de una estructura conectora que tiene una cadena de conexión de 10 átomos o menos. En este contexto, la sal farmacéuticamente aceptable del péptido modificado de la presente invención es preferentemente trifluoroacetato o un acetato.

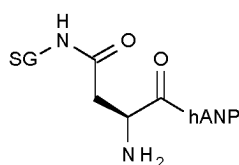
30 (43) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la fórmula de uno de los siguientes compuestos 2-1, 2-3, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-25, 2-26, 2-27, 2-29, o 2-30:

[Fórmula 10]



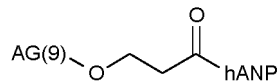
(Compuesto 2-1)

[Fórmula 11]



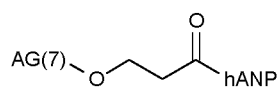
(Compuesto 2-3)

[Fórmula 12]



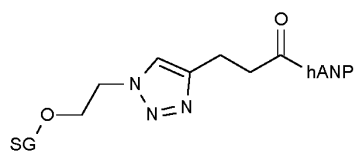
(Compuesto 2-10)

[Fórmula 13]



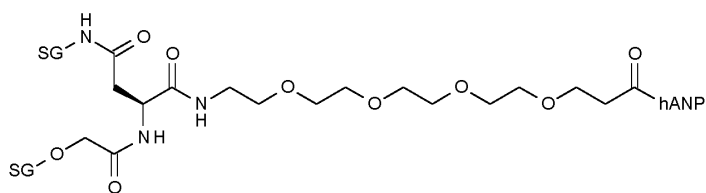
(Compuesto 2-11)

[Fórmula 14]



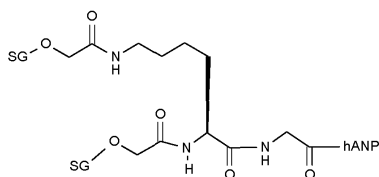
(Compuesto 2-12)

[Fórmula 15]



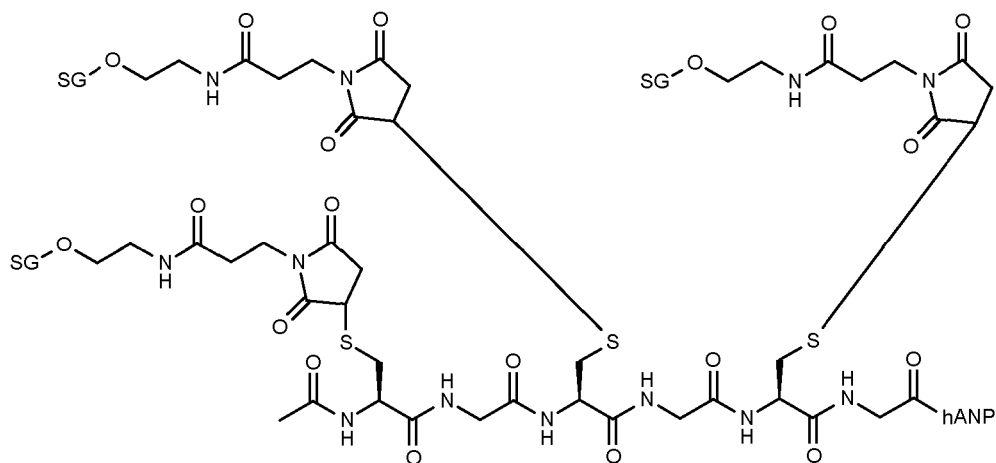
(Compuesto 2-13)

[Fórmula 16]



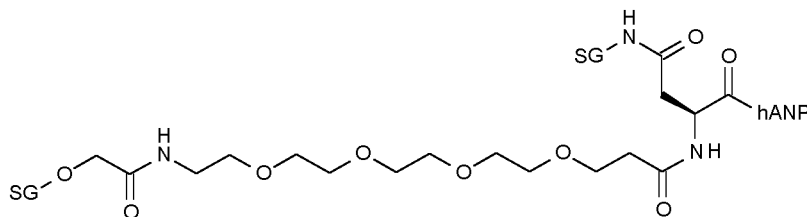
(Compuesto 2-14)

[Fórmula 17]



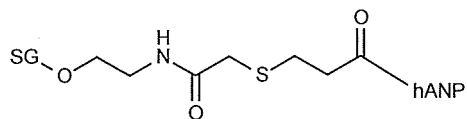
(Compuesto 2-15)

[Fórmula 18]



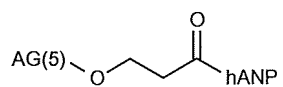
(Compuesto 2-16)

[Fórmula 19]



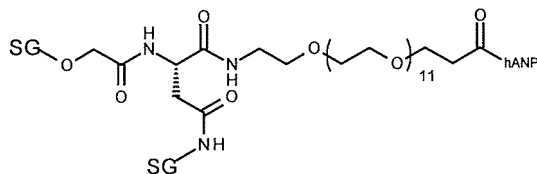
(Compuesto 2-25)

[Fórmula 20]



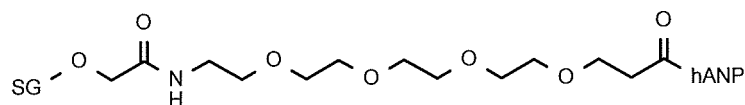
(Compuesto 2-26)

[Fórmula 21]



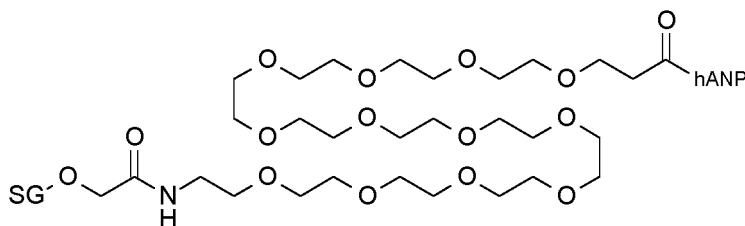
(Compuesto 2-27)

[Fórmula 22]



(Compuesto 2-29)

[Fórmula 23]



(Compuesto 2-30)

en el que hANP es hANP(1-28) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y está unido en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos a la estructura conectora a través de un enlace amida.

5 (44) La sal del péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (1) a (43), preferentemente (42) o (43), en la que la sal farmacéuticamente aceptable es trifluoroacetato o un acetato.

(45) El péptido modificado de acuerdo con (3) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral de un aminoácido en el péptido hANP, y el aminoácido conectado es un aminoácido distinto de los aminoácidos en las posiciones de aminoácido 7 a 23 de SEQ ID NO: 1 contenida en el péptido hANP.

(46) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo exhibe un tiempo de duración prolongado en sangre en comparación con hANP(1-28) sin modificar y mantiene una actividad de elevación de GMPc.

15 (47) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene resistencia a la degradación del péptido hANP mediante endopeptidasa neutra.

(48) El péptido modificado de acuerdo con (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo exhibe 3 o más veces la solubilidad en agua de hANP(1-28) sin modificar.

20 (49) Medicamento que comprende un péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (1) a (48) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(50) El medicamento de acuerdo con (49), en el que el medicamento es un agente para tratar o aliviar una enfermedad cardiovascular.

25 (51) Procedimiento para tratar o aliviar una enfermedad cardiovascular, que comprende administrar una cantidad eficaz de un péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (1) a (48) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(52) Procedimiento para producir un péptido modificado de acuerdo con cualquiera de (1) a (48) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de conectar un péptido hANP, una sustancia de azúcar, y, si fuera necesario, una molécula conectora y un compuesto aceptor.

30 (53) El procedimiento de acuerdo con (52), que comprende además la etapa de transferir una cadena glucídica a un compuesto GlcNAc, un compuesto Glc, o un compuesto Man mediante el uso de Endo-M o una enzima

mutante de la misma.

Efectos ventajosos de la invención

El péptido modificado de la presente invención exhibe un tiempo de duración prolongado en sangre en comparación con hANP(1-28) sin modificar (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "hANP nativo") y mantiene una actividad de elevación de GMPc. El péptido modificado de la presente invención es por lo tanto capaz de exhibir eficacia clínicamente mediante administración no continua y es aplicable a enfermedades en las que hANP nativo no tiene ningún efecto terapéutico. Además, este péptido modificado es superior en solubilidad en agua con respecto a hANP nativo y por lo tanto es susceptible de diversos procedimientos de administración basados en dosis mayores, concentraciones mayores, etc., de las formulaciones. Por lo tanto, este péptido modificado puede satisfacer diversas necesidades médicas, que no se pueden conseguir con hANP nativo.

Breve descripción del dibujo

[Figura 1] La Figura 1 muestra la gráfica de RMN de SG-oxa/compuesto 1-12A.

Descripción de realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle.

La presente invención proporciona un péptido modificado en el que al menos una sustancia de azúcar está conectada directamente a través de un enlace glucosídico o a través de una estructura conectora al menos a un péptido hANP. El péptido modificado de la presente invención exhibe un tiempo de duración prolongado en sangre en comparación con hANP(1-28) sin modificar y mantiene la actividad de elevación de GMPc poseída por hANP(1-28). El péptido modificado de la presente invención es un péptido modificado que se ha aislado del mundo natural y se ha producido artificialmente mediante el control del procedimiento de producción y tiene una estructura básicamente homogénea. El péptido modificado de la presente invención no incluye ningún péptido que se pueda encontrar en la naturaleza y se produce biológicamente *in vivo* o en células cultivadas. Tal sustancia de origen natural propiamente dicha se excluye definitivamente del ámbito de la presente invención.

En la presente invención, el término "conectado" que se describe para una pluralidad de unidades estructurales (por ejemplo, péptido hANP, sustancia de azúcar, y estructura conectora) significa que estas unidades estructurales están unidas directamente a través de un enlace covalente o indirectamente a través de una estructura conectora de un modo tal que las unidades estructurales existan en una molécula. La estructura química que conecta las unidades estructurales no se limita de forma particular. En el caso de conexión a través de una estructura lineal, cada una de las unidades estructurales está contenida en una molécula. En el caso de conexión a través de una estructura ramificada, una pluralidad de cualquiera de las dos o ambas unidades estructurales puede estar contenida en una molécula. El patrón de unión entre la estructura conectora y cada unidad estructural no se limita de forma particular y se selecciona de acuerdo con el tipo de unidad estructural que se conecta.

<Péptido hANP>

En la presente invención, el "péptido hANP" significa un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos los aminoácidos en las posiciones 7 a 27 en la secuencia de aminoácidos del péptido natriurético auricular humano (SEQ ID NO: 1; en lo sucesivo en el presente documento, también denominado hANP o hANP(1-28)), que es un péptido biológicamente activo que consiste en 28 aminoácidos. El hANP exhibe su actividad biológica mediante la unión al receptor GC-A (Chinkers M, y col., Nature 338; 78-83, 1989) expresado en la superficie celular, activando la guanilato ciclasa presente en el dominio intracelular del receptor, y elevando la concentración intracelular de GMPc. Al igual que hANP nativo, α -hANP descrito en Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 118, pág. 131, 1984, se ha aprobado para fabricación y comercialización con el nombre genérico de "carperitida" en Japón y está disponible en el mercado (nombre comercial: HANP). α -hANP también se conoce generalmente como pro-ANP[99-126] Humano.

hANP tiene una estructura de anillos intramolecular formada por restos de Cys en las posiciones 7 y 23 de SEQ ID NO: 1 a través de un enlace disulfuro. Se conoce que esta estructura de anillos y los aminoácidos C-terminales hasta el resto de Arg en la posición 27 son importantes para la activación del receptor GC-A mediante hANP (Silver, MA, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. (2006), 15, pág. 14-21; y A. Calderone, Minerva Endocrinol. (2004), 29, pág. 113-127). hANP(7-27) que consiste en esta estructura de anillos se considera por lo tanto como la unidad mínima para activar GC-A. El péptido hANP de la presente invención es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que puede carecer de los aminoácidos 1 a 6 consecutivamente desde el aminoácido N-terminal y/o un aminoácido en la posición 28 en SEQ ID NO: 1, y es preferentemente un péptido que puede carecer de al menos uno de los aminoácidos en la posición 1, las posiciones 1 y 2, y la posición 28 de SEQ ID NO: 1, más preferentemente un péptido (hANP(2-28), hANP(3-28), etc.) que consiste en una secuencia de aminoácidos que puede carecer de un aminoácido en la posición 1 o los aminoácidos en las posiciones 1 y 2 de SEQ ID NO: 1, lo más preferentemente un péptido (hANP(1-28)) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Algunos ejemplos del péptido modificado de la presente invención en el que el péptido hANP y la sustancia de azúcar están unidos directamente sin el medio de la estructura conectora pueden incluir péptidos modificados en los que uno cualquiera o dos o más de los grupos hidroxilo en las cadenas laterales de Ser en las posiciones 1, 5, 6, y 25 y Tyr en la posición 28 de SEQ ID NO: 1 están unidos directamente a través de un enlace O-glucosídico a la sustancia de azúcar, y péptidos modificados en los que un grupo amida en la cadena lateral de Asn en la posición 26 de SEQ ID NO: 1 está unido directamente a través de un enlace N-glucosídico a la sustancia de azúcar (en producción, el enlace amida también se puede formar por conversión del aminoácido de la posición en Asp y reacción de la sustancia de azúcar con un extremo reductor azidado).

En el caso del péptido modificado de la presente invención en el que el péptido hANP y la sustancia de azúcar están conectados a través de una estructura conectora, como se menciona posteriormente con detalle, la sustancia de azúcar puede estar conectada a: un grupo funcional en la cadena lateral de un aminoácido que constituye el péptido hANP, el extremo N-terminal, y/o el extremo C-terminal mediante la adopción de diversas estructuras conectoras. El sitio en el péptido hANP al que se conecta la sustancia de azúcar es preferentemente el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal, más preferentemente el extremo N-terminal.

El péptido modificado de la presente invención puede comprender un péptido hANP en una molécula o puede ser un péptido modificado polivalente de hANP que comprende dos o más péptidos hANP. El péptido modificado polivalente de hANP se puede producir de forma apropiada mediante la selección de una molécula conectora que tiene una pluralidad de grupos funcionales capaces de unirse a los péptidos hANP de un modo tal que una pluralidad de moléculas de hANP pueden estar conectadas a la estructura conectora.

<Sustancia de azúcar>

En la presente invención, la "sustancia de azúcar" significa una unidad estructural que consiste en un monosacárido o una unidad estructural de dos o más monosacáridos unidos entre sí a través de un enlace glucosídico. En la presente invención, la sustancia de azúcar también se denomina "GLY". Como alternativa, un monosacárido o una cadena glucídica específica también se puede indicar mediante una abreviatura, por ejemplo, "GlcNAc-" o "SG-". La sustancia de azúcar representada por una fórmula estructural con estas abreviaturas está unida en el átomo de carbono en la posición 1, que es un extremo reductor, a la estructura conectora o al péptido hANP a través de un enlace O u N-glucosídico, a menos que se especifique lo contrario. El átomo de oxígeno o el átomo de nitrógeno que pertenece al enlace glucosídico no se incluye en las abreviaturas que indican la sustancia de azúcar, a menos que se defina de otro modo.

En la presente memoria descriptiva, el monosacárido que sirve como la unidad básica de la sustancia de azúcar está indicado en su estructura de anillos en la que un átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno que constituye el anillo y unido directamente al grupo hidroxilo (o el átomo de oxígeno que pertenece al enlace glucosídico) se define como la posición 1 (posición 2 solo para ácido siálico) por razones de conveniencia, a menos que se especifique lo contrario. Los compuestos que se describen en los Ejemplos se nombran a la luz de sus estructuras químicas completas, de modo que esta regla no es necesariamente aplicable a ello.

El monosacárido contenido en la sustancia de azúcar no se limita de forma particular siempre que el monosacárido tenga la estructura básica de un azúcar. Se pueden usar diversos monosacáridos tales como azúcares de 6 miembros y 5 miembros. El monosacárido puede ser un azúcar que se encuentra en la naturaleza o puede ser un azúcar sintetizado artificialmente. Es preferente un azúcar que se encuentra en la naturaleza. Algunos ejemplos del monosacárido pueden incluir glucosa (Glu), fructosa (Flu), manosa (Man), galactosa (Gal), glucosamina (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido glucurónico (GlucA), ácido neuramínico (Neu), ácido siálico/ácido N-acetilneuramínico (NeuNAc/Neu5Ac), galactosamina, N-acetilgalactosamina (GalNAc), xilosa (Xilo), ácido idurónico (IdoA), fucosa (Fuc), aldotriosa, gliceraldehído, aldotetrosa, eritrosa, treosa, aldopentosa, ribosa, lixosa, arabinosa, aldohexosa, alosa, talosa, gulosa, aldosa, idosa, cetotriosa, dihidroxiacetona, cetotetrosa, eritrolulosa, cetopentosa, xilulosa, ribulosa, cetohehexosa, psicosa, sorbosa, y tagatosa.

Se puede usar un oligosacárido o un polisacárido compuesto por una pluralidad de monosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos como la sustancia de azúcar de la presente invención. El oligosacárido no se limita de forma particular siempre que estén unidos un número deseado de monosacáridos a través de enlaces glucosídicos. Algunos ejemplos de los mismos pueden incluir: disacáridos tales como sacarosa, maltosa, lactosa, y trehalosa; trisacáridos tales como maltotriosa, melecitosa, y rafinosa; y tetrasacáridos tales como nistosa, nigerotetraosa, y estaquirosa. Algunos ejemplos del polisacárido pueden incluir amilosa, glucógeno, celulosa, quitina, quitosano, condroitina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, dextrano, y sulfato de dextrano.

La sustancia de azúcar de la presente invención puede ser una cadena glucídica. La "cadena glucídica" puede ser una cadena glucídica natural que se produce *in vivo* o se genera mediante el metabolismo y está compuesta por dos o más monosacáridos unidos a través de un enlace glucosídico o puede ser una cadena glucídica alterada que tiene una alteración artificial añadida con respecto a la estructura de la cadena glucídica natural. La cadena glucídica natural existe como una cadena glucídica (carbohidrato) o en forma de una glucoproteína o un glucolípido en animales, plantas, microorganismos, etc., y se puede obtener por aislamiento y purificación de las mismas. La cadena glucídica alterada es una cadena glucídica alterada artificialmente a partir de la estructura de cadena

glucídica de la cadena glucídica natural. El procedimiento de alteración puede ser por medio de una síntesis química o adición química de enzima, sustitución, y/o supresión de uno o más monosacáridos en una cadena glucídica de origen natural y es preferentemente una alteración que suprime un azúcar en el extremo no reductor mediante el uso de una glucosidasa apropiada para el azúcar en el extremo no reductor. El número de monosacáridos contenidos en la cadena glucídica no se limita de forma particular siempre que el número sea dos o más. Se puede seleccionar un número arbitrario de monosacáridos entre, por ejemplo, aproximadamente 50 o menos, aproximadamente 40 o menos, y aproximadamente 30 monosacáridos o menos. Preferentemente, el número de monosacáridos contenidos en la cadena glucídica es aproximadamente 25 o menos, más preferentemente aproximadamente 20 o menos, incluso más preferentemente aproximadamente 15 o menos, además preferentemente 11 o menos.

La cadena glucídica de la presente invención puede ser lineal o ramificada. La cadena glucídica lineal es una cadena glucídica en la que todos los monosacáridos contenidos en la cadena glucídica excepto el azúcar en el extremo no reductor están conectados de forma lineal de un modo tal que cada monosacárido esté unido en un átomo de carbono distinto del átomo de carbono en la posición 1 de su estructura de anillo, ya sea directamente o a través de un sustituyente, al átomo de carbono en la posición 1 (posición 2 para ácido siálico) de otro monosacárido a través de un enlace glucosídico.

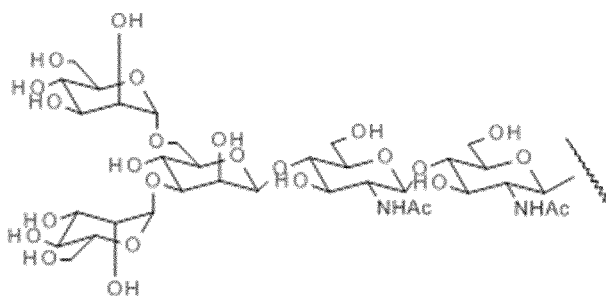
Por otra parte, la cadena glucídica ramificada es una cadena glucídica en la que uno o más monosacáridos contenidos en la cadena glucídica están conectados de forma ramificada de un modo tal que al menos un monosacárido esté unido en dos o más átomos de carbono distintos del átomo de carbono en la posición 1 en su estructura de anillo, ya sea directamente o a través de un sustituyente, a los átomos de carbono en las posiciones 1 (posiciones 2 para ácido siálico) de otros monosacáridos a través de enlaces glucosídicos. Para las cadenas glucídicas tanto lineales como ramificadas, el extremo (extremo reductor) en el lado del carbono de posición 1 de la estructura de anillo está constituido por un monosacárido, y el átomo de carbono en la posición 1 (posición 2 para ácido siálico) del azúcar en este extremo reductor está unido a través de un enlace O u N-glucosídico a la estructura conectora o al péptido hANP.

Por otra parte, el monosacárido en el extremo no reductor de la cadena glucídica no forma un enlace glucosídico con otro azúcar en un sitio distinto del átomo de carbono en la posición 1 (posición 2 para ácido siálico). La cadena glucídica tiene el mismo número de extremos no reductores que número de ramificaciones y se altera principalmente en su extremo no reductor.

Las cadenas glucídicas contenidas en glucoproteínas naturales se clasifican ampliamente en cadenas glucídicas N-conectadas unidas a la asparagina de una glucoproteína y cadenas glucídicas O-conectadas unidas a la serina o treonina de la misma, teniendo ambas sus estructuras básicas características. Naturalmente, la cadena glucídica N-conectada está unida a través de un enlace N-glucosídico a la cadena lateral de aminoácido de una proteína, mientras que la cadena glucídica O-conectada está unida a través de un enlace O-glucosídico a ella. Las cadenas glucídicas artificiales pueden estar unidas a otros compuestos a través de cualquier enlace glucosídico. De ese modo, el tipo de enlace glucosídico no está limitado por la estructura de tal cadena glucídica. Por ejemplo, la sustancia de azúcar se azida en su extremo reductor, y esta sustancia de azúcar azidada se puede hacer reaccionar con un compuesto que tiene un grupo carboxilo en presencia de trifenilfosfina para unir el compuesto que tiene la estructura deseada a la sustancia de azúcar a través de un enlace N-glucosídico. Como alternativa, la sustancia de azúcar se puede hacer reaccionar con un compuesto que tiene un grupo hidroxilo, tal como un alcohol, para unir la sustancia de azúcar al compuesto deseado a través de un enlace O-glucosídico.

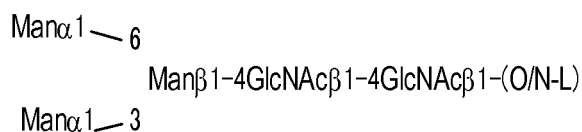
La estructura básica de la cadena glucídica N-conectada está representada por la siguiente fórmula (fórmula estructural (I) y secuencia (II)). Una cadena glucídica que tiene esta estructura de cadena glucídica se denomina AG(5).

[Fórmula 24]



(I)

[Fórmula 25]



(II)

En la fórmula anterior, "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico. En la fórmula anterior, las cadenas glucídicas alteradas en el extremo reductor mediante el reemplazo de GlcNAc en el extremo reductor con Glc o Man se denominan AG(5-Glc) y AG(5-Man), respectivamente.

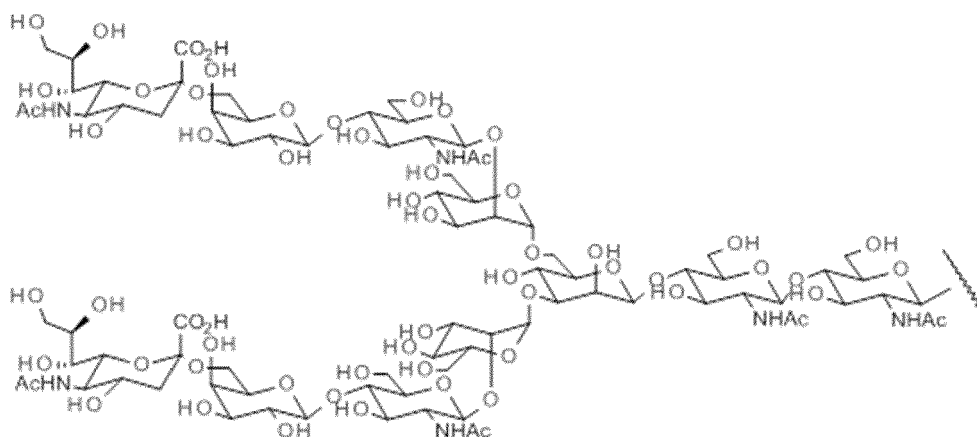
- 5 La mayoría de las cadenas glucídicas N-conectadas tienen esta estructura básica. Su extremo no reductor o azúcar ramificado se puede unir además a una cadena glucídica.

Las cadenas glucídicas humanas o las cadenas glucídicas compatibles con humanas son cadenas glucídicas que se conocen por no exhibir ninguna antigenicidad en los tejidos de seres humanos. Por ejemplo, se conocen formas de alto contenido en manosa, complejas, y compuestas de cadenas glucídicas N-conectadas. La forma de alto contenido en manosa es una cadena glucídica que tiene una estructura rica en manosa compuesta por una pluralidad de moléculas de manosa en el extremo no reductor de la estructura básica N-conectada. La forma compleja es una cadena glucídica que tiene una estructura de motivo Gal β 1-4GlcNAc en el extremo no reductor de la estructura básica N-conectada. La cadena glucídica compuesta es una cadena glucídica que tiene una estructura de motivo Gal1 β -4GlcNAc en el extremo no reductor de la estructura básica N-conectada y que también tiene una estructura rica en manosa compuesta por una pluralidad de moléculas de manosa.

<SG, AG (n) >

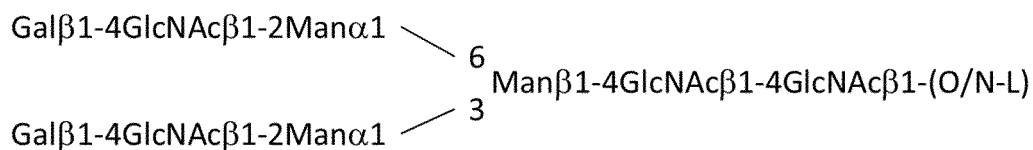
La cadena glucídica compleja N-conectada es por lo general una cadena glucídica contenida en sialilglucopéptido (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "SGP") contenido en la yema de huevo de gallina. Algunos ejemplos del mismo pueden incluir sialil glicano (en lo sucesivo el presente documento, denominado "SG") que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula estructural (III) y la secuencia (IV):

[Fórmula 26]



(III)

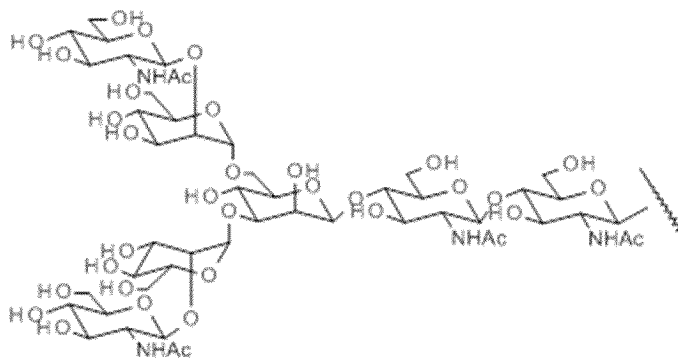
[Fórmula 29]



(VI)

En la fórmula anterior, "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico. En la fórmula anterior, las cadenas glucídicas alteradas en el extremo reductor mediante el reemplazo de GlcNAc en el extremo reductor con Glc o Man se denominan AG(9-Glc) y AG(9-Man), respectivamente.

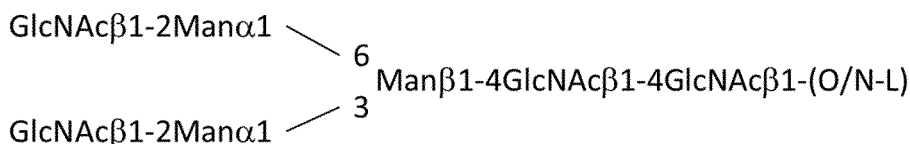
[Fórmula 30]



(VII)

5

[Fórmula 31]



(VIII)

En la fórmula anterior, "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico o un enlace N-glucosídico. En la fórmula anterior, las cadenas glucídicas alteradas en el extremo reductor mediante el reemplazo de GlcNAc en el extremo reductor con Glc o Man se denominan AG(7-Glc) y AG(7-Man), respectivamente.

- 10 El péptido modificado de la presente invención no está limitado por el número máximo de sustancias de azúcar siempre que, en una molécula, esté conectada al menos una sustancia de azúcar al péptido hANP. El número de sustancias de azúcar es, por ejemplo, 20 o menos, más preferentemente 15 o menos, incluso más preferentemente 12 o menos, además preferentemente 10 o menos, aún más preferentemente 5 o menos, aún más preferentemente 1, 2, 3 o 4, lo más preferentemente 1 o 2. Las sustancias de azúcar contenidas en una molécula pueden tener la misma estructura o pueden ser una mezcla de sustancias de azúcar que difieren en la estructura. Preferentemente, 15 la totalidad de estas sustancias de azúcar son sustancias de azúcar idénticas.

En la presente invención, en el caso de usar una cadena glucídica que deriva de glucoproteína o glucolípido que se encuentra en la naturaleza como la sustancia de azúcar, la cadena glucídica se puede usar después de escindirse o aislarse o transferirse a un compuesto deseado (compuesto aceptor) a través de transglucosilación mediante el uso de una enzima. La enzima para su uso en tal reacción se puede seleccionar entre diversas enzimas conocidas en la técnica de acuerdo con la estructura de la cadena glucídica usada (Endo-A: Li, B., y col., J. Am. Chem. Soc. 127 (2005), pág. 9692-9693; Endo-F: Wei Huang., y col., ChemBioChem 12 (2011), pág. 932-941; Endo-D: Shu-Quan

Fan, y col., J. Biol. Chem. 287 (2012), pág. 11272-11281; y Endo-S: Wei Huang, y col., J. Am. Chem. Soc. 134 (2012), pág. 12308-12318.). A modo de ejemplo de tal enzima, por ejemplo, se conocen endo- β -N-acetilglucosaminidasas como una serie de familias de enzimas que hidrolizan enlaces β -glucosídicos en estructuras de quitobiosa y se conocen como Endo-A, Endo-D, Endo-F, Endo-M, Endo-S, etc., de acuerdo con su origen.

5 De ellas, Endo-M obtenida a partir de *Mucor hiemalis* tiene la actividad de hidrolizar el enlace glucosídico entre GlcNAc-GlcNAc en el lado del extremo reductor en una cadena glucídica que tiene una estructura básica N-conectada. Además, esta enzima incluso tiene la actividad de transferir y unir una cadena glucídica en el lado del extremo no reductor que contiene el segundo extremo reductor GlcNAc escindido mediante esta hidrólisis de la estructura básica de cadena glucídica N-conectada, a la posición 4 de GlcNAc de otro compuesto aceptor que tiene un sitio de GlcNAc (véase, por ejemplo, Y. Tomabechi, y col., Bioorg. Med. Chem., 18 (2010), pág. 1259-1264). Además, se conoce que cuando se usa un compuesto que tiene la estructura de una unidad de azúcar diferente (por ejemplo, Glc o Man) en lugar de GlcNAc como compuesto aceptor en reacciones de transglucosilación similares usando Endo-M, la reacción de transferencia similar transcurre en una posición en la unidad de azúcar que corresponde a la posición 4 de GlcNAc (Endoglicosidasas - Biochemistry, Biotechnology, Application, Masahiko Endo y col. Kodansha, Tokio (2006)).

La estructura de la cadena glucídica que sirve como sustrato de Endo-M puede ser cualquier estructura de cadena glucídica que tenga una estructura básica N-conectada, y se pueden usar diversas cadenas glucídicas tales como formas de alto contenido en manosa, complejas, y compuestas, como sustrato. AG(5), AG(7), AG(9), y SG también sirven como sustratos de Endo-M. Endo-M N175Q, que es un mutante de Endo-M, es un mutante que exhibe actividad de hidrólisis reducida mientras que mantiene la especificidad del sustrato y la actividad de transglucosilación de Endo-M. Endo-M N175Q es particularmente preferente para unir una cadena glucídica a un compuesto deseado a través de una reacción de transglucosilación. En el caso de usar Endo-M N175Q, por ejemplo, se puede usar un resto de cadena glucídica escindido tal como SG-Oxa como donador de cadena glucídica, o se puede usar un glucopéptido o una glucoproteína tal como SGP (Midori Umekawa y col. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 285, 2010, pág. 511-521 (que también describe informes de otros mutantes)). Endo-M y las enzimas mutantes de la misma se pueden producir mediante ingeniería genética mediante procedimientos conocidos en la técnica. Como alternativa, Endo-M y Endo-M N175Q se pueden adquirir como reactivos disponibles en el mercado (distribuidor: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.).

En el caso de usar una cadena glucídica escindida mediante el uso de hidrolasa, el sustrato se puede hacer reaccionar con hidrolasa a una temperatura apropiada durante un tiempo apropiado, y la cadena glucídica se puede aislar de la solución de reacción obtenida.

La cadena glucídica escindida se puede usar como tal o se puede modificar en su extremo reductor para su uso. Por ejemplo, en el caso de una cadena glucídica que tiene GlcNAc en el extremo reductor, esta cadena glucídica se puede tratar con DMC y aislar como GLY(GlcNAc)-oxa (específicamente, SG-Oxa que tiene un anillo de oxazolina formado entre un grupo hidroxilo unido al átomo de carbono en la posición 1 y un grupo N-acetilo unido al átomo de carbono en la posición 2 en la estructura de anillos de GlcNAc). La cadena glucídica escindida de ese modo se puede usar como sustrato para la reacción de transferencia a la molécula conectora (compuesto de GlcNAc) y unir de ese modo a un compuesto deseado.

El caso de transferir una cadena glucídica a un compuesto deseado mediante el uso de una glucosiltransferasa, se hacen reaccionar un sustrato (donador de cadena glucídica), un compuesto aceptor, y una glucosiltransferasa a una temperatura apropiada durante un tiempo apropiado, y el compuesto de interés se obtiene a partir de la solución de reacción resultante mediante el aislamiento del compuesto preparado por transferencia y unión de la cadena glucídica de interés al compuesto aceptor. Por ejemplo, en el caso de usar SGP como sustrato, un compuesto de GlcNAc como compuesto aceptor, y Endo-M N175Q como glucosiltransferasa, una cantidad apropiada del compuesto de GlcNAc y SGP a una dosis apropiada para la valencia de GlcNAc del compuesto de GlcNAc se agitan de 20 a 40 °C (preferentemente 20 a 30 °C, más preferentemente de 22 a 27 °C, lo más preferentemente 25 °C) durante 1 a 10 horas (preferentemente 2 a 8 horas, más preferentemente 3 a 6 horas) en presencia de Endo-M-N175Q y, si se desea, una cantidad apropiada de DMSO, y el producto de reacción resultante se puede purificar mediante el uso de HPLC en fase inversa (ODS; que emplea una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes).

Un grupo funcional tal como un grupo amino (SG-NH₂, etc.), un grupo carboxilo (SG-A, etc.), un grupo azida (SG-N₃, etc.), un grupo maleimida (SG-M), o un grupo α -yodoacetilamida (SG-I) se puede unir al extremo reductor de la cadena glucídica a través de tal reacción de transferencia mediante el uso de diversos compuestos de GlcNAc mencionados posteriormente. La cadena glucídica preparada de ese modo se puede conectar a una estructura conectora deseada.

El compuesto unido a cadena glucídica obtenido de ese modo se puede unir directamente al péptido hANP o se puede conectar al péptido hANP a través de otra molécula conectora.

En este contexto, el "compuesto aceptor" incluye un azúcar que no experimenta ninguna modificación excepto por el enlace glucosídico en el carbono de la posición 1, y no se limita de forma particular siempre que el compuesto sirva

como aceptor de azúcar en la reacción de transglucosilación. Preferentemente, un "compuesto de GlcNAc" (que se mencionará posteriormente con detalle) que contiene GlcNAc como azúcar, un "compuesto de Glc" que contiene Glc como azúcar, un "compuesto de Man" que contiene Man como azúcar, o similar se puede usar como compuesto aceptor. Un compuesto de GlcNAc es lo más preferente.

5 <Estructura conectora>

En la presente invención, la estructura conectora significa una estructura química que media la conexión entre el péptido hANP y la sustancia de azúcar en el péptido modificado de la presente invención. La estructura conectora está unida al menos en un sitio al péptido hANP y unida al menos en un sitio a la sustancia de azúcar a través de un enlace glucosídico.

- 10 Para la conexión entre el péptido hANP y la estructura conectora, la estructura conectora puede estar unida a cualquier posición seleccionada entre el grupo amino N-terminal del péptido hANP, el grupo carboxilo C-terminal del péptido hANP, y al menos una cadena lateral de los aminoácidos constituyentes del péptido hANP. El número de posiciones de unión puede ser uno o dos o más. En el caso de unirse a una cadena lateral de aminoácido, se puede proporcionar un compuesto deseado que tiene un grupo funcional apropiado para unirse a cada grupo funcional que es un grupo hidroxilo en la cadena lateral de Ser en la posición 1, 5, 6, o 25 de SEQ ID NO: 1 o Tyr en la posición 28, o que es un grupo amida en la cadena lateral de Asn en la posición 26, o similar.

- 15 En la notación de un péptido modificado de la presente invención o una estructura parcial del mismo, el extremo N-terminal (grupo amino) y el extremo C-terminal (grupo carboxilo) de un aminoácido o un péptido se indican a la izquierda o a la derecha, respectivamente, a menos que se especifique lo contrario. Un aminoácido o un péptido con el símbolo "*" a la derecha (por ejemplo, Gln*) representa que, a diferencia de esta regla, el extremo C-terminal y el extremo N-terminal se indican a la izquierda y a la derecha, respectivamente.

En la notación de un aminoácido, un grupo amino y un grupo carboxilo, que son estructuras esenciales de un aminoácido, directamente unidos al átomo de carbono central (carbono α) se denominan "grupo amino α " y "grupo carboxilo α ", respectivamente.

- 25 Cuando la sustancia de azúcar está conectada al menos a uno del extremo N-terminal (grupo amino) y el extremo C-terminal (grupo carboxilo) del péptido hANP, el péptido hANP y la estructura conectora forman un enlace amida. Un péptido modificado en el que la sustancia de azúcar está conectada al extremo N-terminal del péptido hANP a través de una estructura conectora se representa como sigue a continuación:



- 30 en la que GLY representa la sustancia de azúcar; L representa la estructura conectora que es lineal y tiene dos o más ramificaciones; hANP representa el péptido hANP; L está unida a través de un enlace O u N-glucosídico a GLY; cuando L está ramificada, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y L está unida a través de un enlace amida al extremo N-terminal del péptido hANP.

- 35 En la notación de un péptido modificado o una estructura parcial del mismo en la presente memoria descriptiva, cuando un aminoácido o un péptido está conectado en su grupo amino N-terminal a otro conector, se indica un símbolo que representa la unidad estructural que se conecta con un guion y sin paréntesis en el lado izquierdo de un símbolo que representa este péptido o aminoácido. En este caso, el guion representa el enlace amida formado entre el grupo amino del péptido o el aminoácido y el grupo carboxílico portado por la estructura conectora. Por ejemplo, una estructura en la que SG está conectado al grupo amino de Asn se denomina "SG-Asn".

- 40 Un péptido modificado en el que la sustancia de azúcar está conectada al extremo C-terminal del péptido hANP a través de una estructura conectora se representa como sigue a continuación:



- 45 en la que GLY representa la sustancia de azúcar; L representa la estructura conectora que es lineal y tiene dos o más ramificaciones; hANP representa el péptido hANP; L está unida a través de un enlace O u N-glucosídico a GLY; cuando L está ramificada, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y L está unida a través de un enlace amida al extremo C-terminal del péptido hANP.

- 50 Específicamente, en la notación de un péptido modificado o una estructura parcial del mismo en la presente memoria descriptiva, cuando un aminoácido o un péptido está conectado en su grupo carboxilo C-terminal a otra unidad estructural, se indica un símbolo que representa la unidad estructural que se conecta con un guion y sin paréntesis en el lado derecho de un símbolo que representa este péptido o aminoácido. En este caso, el guion representa el enlace amida formado entre el grupo carboxilo C-terminal del péptido o el aminoácido y el grupo amino (o el grupo azida) portado por la estructura conectora. Por ejemplo, una estructura en la que SG está conectado al grupo carboxilo de Tyr se denomina "Tyr-SG".

En la presente invención, un péptido modificado en el que la sustancia de azúcar está conectada tanto al extremo N-

terminal como al extremo C-terminal del péptido hANP se representa mediante la siguiente fórmula C:



en la que GLY representa una sustancia de azúcar; L1 y L2 pueden ser iguales o diferentes y cada una representa la estructura conectora que es lineal o tiene dos o más ramificaciones; hANP representa el péptido hANP; L1 y L2 están unidas cada una a través de un enlace O u N-glucosídico a GLY; cuando L1 o L2 está ramificada, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; y L1 y L2 están unidas a través de enlaces amida a cada uno del extremo N-terminal y el extremo C-terminal del péptido hANP, respectivamente.

En un péptido modificado de la presente invención o una estructura parcial del mismo, la estructura parcial en la que la sustancia de azúcar está conectada a una cadena lateral de aminoácido se representa mediante la siguiente fórmula D:



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; AA representa un aminoácido arbitrario; y la cadena lateral del aminoácido está unida a través de un enlace O u N-glucosídico, directamente o a través de una estructura conectora, a GLY.

Específicamente, en la notación del péptido modificado o una estructura parcial del mismo en la presente memoria descriptiva, cuando un aminoácido o un péptido está conectado en su grupo funcional de cadena lateral a otra unidad estructural, se indica un símbolo que representa la unidad estructural que se une con un guion y paréntesis en el lado izquierdo de un símbolo que representa el aminoácido conectado. En este caso, el guion representa una estructura química que contiene el enlace glucosídico en el extremo reductor de la sustancia de azúcar. Cuando esta conexión está mediada por una estructura conectora, también se puede describir una característica estructural de la estructura conectoras (por ejemplo, (SG-PEG(3)-)Asn). Sin embargo, cuando la estructura conectora no tiene tal estructura característica o no se define, esta se puede omitir (por ejemplo, (SG-)Lys). Los nombres de los compuestos que se describen en los Ejemplos representan compuestos específicos representados por las fórmulas estructurales que se proporcionan en el presente documento.

De acuerdo con tales reglas, una estructura parcial en la que SG se conecta tanto al grupo amino de cadena lateral como al grupo amino α de Lys se denomina "SG-(SG-)Lys". Asimismo, una estructura parcial en la que SG se conecta tanto al grupo carboxilo de cadena lateral como al grupo carboxilo α de Glu se denomina "(SG-)Gln-SG" o "SG-(SG-)Gln*" (en la que Asp y Glu tienen la misma estructura que Asn/Gln cuando el grupo carboxilo de cadena lateral forma un enlace amida; y Gln* significa que el grupo carboxilo está situado a la izquierda y el Grupo amino está situado a la derecha).

Cuando una molécula contiene una pluralidad de péptidos hANP, se adoptan notaciones individuales. Por ejemplo, la estructura en la que la sustancia de azúcar está conectada al grupo carboxilo α de Lys y los extremos N-terminales de los péptidos hANP están conectados respectivamente al grupo amino α y el grupo amino de cadena lateral a través de conectores de PEG se denomina "GLY-Lys*(-PEG-hANP)₂".

La sustancia de azúcar y la estructura conectora están unidos a través de un enlace N u O-glucosídico al átomo de carbono en la posición 1 del extremo reductor de la sustancia de azúcar. A este respecto, la configuración del enlace glucosídico se puede seleccionar como cualquiera de la posición α y la posición β . Cualquier patrón de unión se puede sintetizar selectivamente de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica (Tomoya Ogawa, y col., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), pág. 281-285.; y Mamoru Mizuno, y col., 121 (1999), pág. 284-290.). En el caso de usar una cadena glucídica obtenida a partir de una proteína natural, se selecciona de forma deseable el mismo patrón que el patrón de unión de origen natural de esta cadena glucídica. Cuando la sustancia de azúcar es, por ejemplo, SG o una cadena glucídica alterada de la misma, se selecciona de forma deseable la posición β para el enlace glucosídico con la estructura conectora.

Cuando la sustancia de azúcar se indica mediante un símbolo (por ejemplo, GLY, SG, o GlcNAc) en la presente memoria descriptiva, este símbolo también incluye el carbono en el extremo reductor y excluye N u O que pertenecen al enlace N u O-glucosídico, a menos que se defina de otro modo. Asimismo, cuando el péptido hANP se indica mediante un símbolo (por ejemplo, hANP o hANP(1-28)), el símbolo también incluye -NH N-terminal y C=O C-terminal como regla. El extremo N-terminal y el extremo C-terminal se indican a la izquierda y a la derecha, respectivamente, a menos que se especifique lo contrario. Específicamente, un péptido hANP sin modificar se denomina H-hANP-OH.

La estructura química de la estructura conectora contenida en el péptido modificado de la presente invención tiene un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno unido a través de un enlace glucosídico al menos a una sustancia de azúcar y una estructura parcial unida al menos a un péptido hANP (NH o C=O para un enlace amida o una estructura (que se mencionara posteriormente) apropiada para la estructura de cada cadena lateral para conectar a una cadena lateral del péptido hANP). Otras estructuras no se limitan y se pueden obtener a partir de una molécula individual o pueden ser una pluralidad de estructuras parciales en las que están unidas una pluralidad de moléculas.

Tal molécula a partir de la que se obtiene la estructura conectora se denomina "molécula conectora". Cuando están contenidas una pluralidad de estructuras parciales en la estructura conectora, estas estructuras parciales se pueden indicar mediante "Lx" de acuerdo con las estructuras parciales. Por ejemplo, la estructura parcial unida directamente a la sustancia de azúcar se indica mediante "Lg". Esta estructura parcial satisface completamente las definiciones aplicadas a la estructura conectora excepto para la estructura unida directamente al péptido hANP. Además, la estructura parcial unida directamente al péptido hANP se indica mediante "Lp". Esta estructura satisface completamente las definiciones aplicadas a la estructura conectora excepto para la estructura que pertenece al enlace glucosídico con la sustancia de azúcar.

En la estructura conectora de la presente invención, la cadena más corta de átomos que conecta N u O que pertenecen al enlace glucosídico y el átomo unido directamente al péptido hANP (en el caso de un enlace amida, perteneciendo N o C al enlace amida) se denomina "cadena de conexión". La cadena de conexión contiene el átomo que pertenece a cada uno de los enlaces mencionados anteriormente. Por ejemplo, el péptido modificado representado por (GLY)-O-CH₂-C(=O)-(hANP N-term) tiene una estructura conectora que consiste en una cadena de conexión de 3 átomos. Además, el péptido modificado representado por (GLY)-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-NH-(hANP C-term) tiene una estructura conectora que consiste en una cadena de conexión de 5 átomos. La estructura conectora de la presente invención no se limita de forma particular siempre que la estructura conectora tenga una cadena de conexión de 3 o más átomos. La cadena de conexión puede ser, por ejemplo, de 200 átomos o menos y es preferentemente de aproximadamente 150 átomos o menos, más preferentemente de 100 átomos o menos, incluso más preferentemente de 70 átomos o menos, 50 átomos o menos, o 30 átomos o menos, lo más preferentemente de 20 átomos o menos, 15 átomos o menos, o 10 átomos o menos. Para formar tal estructura conectora, se pueden usar una pluralidad de moléculas conectoras para crear una estructura conectora que tenga una cadena de conexión complicada y larga. Preferentemente, se adoptan 5 moléculas conectoras o menos. También es preferente un péptido modificado que contiene una estructura conectora obtenida a partir de 4, 3, 2, o 1 moléculas conectoras.

Cuando la estructura conectora de la presente invención se obtiene a partir de una molécula conectora, esta molécula conectora es un compuesto que contiene, en una molécula, tanto un grupo funcional que se une a través de un enlace glucosídico a la sustancia de azúcar, como un grupo funcional que se une al péptido hANP, y es preferentemente, por ejemplo, un aminoácido o un péptido debido a que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo, más preferentemente un aminoácido que tiene un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, o similar en la cadena lateral. Algunos ejemplos específicos de tal molécula conectora pueden incluir HO-CH₂-COOH, HO-CH₂-CH₂-NH₂, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, y lisina.

Cuando la estructura conectora de la presente invención se obtiene a partir de una pluralidad de moléculas conectoras, se usan como estas moléculas conectoras al menos un compuesto que contiene un grupo funcional capaz de unirse a través de un enlace glucosídico a la sustancia de azúcar, y un compuesto que tiene un grupo funcional capaz de unirse al péptido hANP. Estos dos compuestos también tienen grupos funcionales que permiten que los compuestos se unan entre sí directamente. Como alternativa, estos dos compuestos se pueden conectar entre sí a través de un compuesto adicional. Se puede aplicar un procedimiento conocido en la técnica para la unión entre tales moléculas conectoras. Algunos ejemplos de los mismos pueden incluir, pero no se limitan particularmente, un enlace amida entre un grupo amino y un grupo carboxilo, un enlace entre un grupo SH y un grupo maleimida, un enlace entre un grupo SH y un grupo yodoacetilo, un enlace entre un grupo fenol y un grupo triazoldiona (Hitoshi Ban, y col., 132 (2010), 1523-1525), un enlace éster entre un alcohol y un grupo carboxilo, y un enlace entre un grupo azida y un grupo acetileno por reacción de Huisgen. Las moléculas conectoras que se usan en la presente invención se pueden seleccionar de forma apropiada entre las que tienen grupos funcionales apropiados para estos patrones de unión y se usan en la formación de la estructura conectora.

El péptido modificado de la presente invención necesita exhibir un cierto grado de hidrofiliidad en su totalidad. Por lo tanto, es preferente adoptar una estructura altamente hidrófila cuando la estructura conectora tiene un tamaño superior a cierto nivel. Algunos ejemplos de tal estructura incluyen un polioxialquileo y una poliamida u otras estructuras de repetición biológicamente aplicables.

Algunos ejemplos del polioxialquileo pueden incluir polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polibutilenglicol, y alcohol polivinílico (PVA). Es preferente PEG. En la notación de la estructura conectora que contiene PEG en la presente memoria descriptiva, el número de repeticiones etoxi está representado por, por ejemplo, PEG(3) o PEG(11). Algunos ejemplos de un péptido modificado que tiene tal estructura pueden incluir los compuestos 2-13 y 2-27 a 2-34 preparados en los ejemplos de trabajo.

Como alternativa, la estructura conectora de la presente invención puede contener un aminoácido o una cadena de oligopéptido de dos o más aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico. Tal aminoácido o cadena de oligopéptido puede adoptar una estructura que está directamente unida a través de un enlace amida al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del péptido hANP para prolongar la cadena peptídica del péptido hANP. Como alternativa, esta estructura puede estar conectada al péptido hANP a través de una estructura no peptídica o puede tener ambas de estas estructuras.

El aminoácido contenido en la estructura conectora de la presente invención no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga una estructura de aminoácido en la que están unidos un átomo de hidrógeno, un grupo

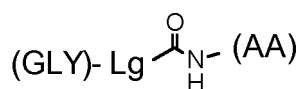
amino, y un grupo carboxilo al mismo átomo de carbono. El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o puede ser un aminoácido artificial. El aminoácido artificial puede ser un aminoácido producido sintéticamente tal como un D aminoácido o puede ser un aminoácido alterado que tiene una cadena lateral modificada artificialmente de un aminoácido de origen natural. El aminoácido es preferentemente un aminoácido de origen natural o un aminoácido alterado, más preferentemente un aminoácido de origen natural. Cuando el péptido modificado de la presente invención se usa como principio activo para un medicamento, es preferente que el aminoácido contenido en la estructura conectora no tenga su propia actividad biológica, y también es preferente adoptar Gly o un aminoácido cuya cadena lateral esté unida a otra estructura. Algunos ejemplos de la estructura conectora que contiene tal aminoácido pueden incluir una estructura conectora que contiene Gly u oligo-Gly que consiste en dos o más restos de Gly y está conectada en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal al péptido hANP y la sustancia de azúcar. Algunos ejemplos de tal péptido modificado pueden incluir el compuesto 2-40 en el que se usa SG(Glc) como sustancia de azúcar y Gly está contenido como el conector.

Por ejemplo, un "aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral", tal como Lys, que tiene un grupo amino de cadena lateral, "un aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral", tal como Cys, que tiene un grupo SH de cadena lateral, "un aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral", tal como ácido aspártico o ácido glutámico, que tiene un grupo carboxilo de cadena lateral, "un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral", tal como serina, que tiene un grupo hidroxilo de cadena lateral, o "un aminoácido que tiene fenol en la cadena lateral", tal como tirosina, que tiene un grupo p-fenol de cadena lateral, se puede adoptar como el aminoácido que tiene tal estructura de cadena lateral. Este aminoácido que tiene la estructura de cadena lateral puede conseguir conectarse a tres sitios, es decir, el grupo amino y el grupo carboxilo unidos al carbono α y el grupo funcional de cadena lateral. Por lo tanto, para formar una estructura conectora ramificada, es preferente que contenga al menos uno de estos aminoácidos que tienen una estructura de cadena lateral.

El aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga al menos un grupo amino (excepto un grupo amida) en la cadena lateral. El aminoácido natural que tiene un grupo amino en la cadena lateral es Lys. Algunos ejemplos de aminoácidos artificiales que tienen un grupo amino en la cadena lateral pueden incluir aminoácidos alterados obtenidos por reacción de una amina divalente tal como 1,2-diaminoetano con el grupo carboxilo de cadena lateral de Glu o Asp.

Cuando la estructura conectora contiene al menos un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral y la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral, se puede tomar una estructura parcial de la siguiente fórmula general:

[Fórmula 32]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; N-(AA) representa un átomo de nitrógeno obtenido a partir del grupo amino de cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo amino de cadena lateral.

La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir introduciendo un grupo protector en el grupo carboxilo del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido, haciendo reaccionar posteriormente con el mismo una molécula conectoras representada por "GLY-Lg-COOH", desprotegiendo el grupo carboxilo, y uniendo el compuesto resultante al péptido hANP o Lp. En esta reacción, cuando el aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral tiene un grupo amino α libre, Lg puede formar una estructura conectora que tiene una estructura ramificada a través de enlaces amida tanto al grupo amino de cadena lateral como al grupo amino α . El péptido modificado constituido de ese modo es, por ejemplo, un péptido modificado que tiene una estructura parcial tal como SG-(SG-)Lys. Algunos ejemplos específicos de tal compuesto pueden incluir los compuestos 2-14 y 2-35 preparados en los ejemplos de trabajo.

En una producción similar, se puede producir un péptido modificado que tiene una estructura parcial en la que el péptido hANP está conectado a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral mediante el reemplazo de Lg(-sustancia de azúcar) con Lp(-péptido hANP). Tal estructura parcial se puede producir introduciendo un grupo protector en el grupo carboxilo del aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido, haciendo reaccionar posteriormente con el mismo una molécula conectora representada por "Lp-COOH", desprotegiendo el grupo carboxilo, y uniendo Lg o la sustancia de azúcar al grupo carboxilo. En esta reacción, cuando el aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral tiene un grupo amino α libre, Lp puede formar una estructura conectora que tiene una estructura ramificada a través

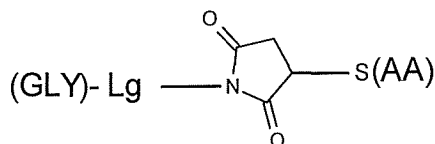
de enlaces amida tanto al grupo amino de cadena lateral como al grupo amino α . El péptido modificado constituido de ese modo es, por ejemplo, un péptido modificado que tiene una estructura parcial tal como Lp-(Lp-)Lys-Lg. Algunos ejemplos específicos de tal compuesto pueden incluir los compuestos 2-38 y 2-39. Además, se puede producir de forma apropiada un péptido modificado que contiene una pluralidad de sustancias de azúcar y/o una pluralidad de péptidos hANP en una molécula mediante el uso combinado con otras moléculas conectoras que tienen diversas estructuras.

Como alternativa, se puede formar una estructura que tiene un gran número de grupos amino mediante la formación repetida de los enlaces amida respectivos del grupo amino de cadena lateral o el grupo amino α de cada aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral con los grupos carboxilo α de aminoácidos idénticos que tienen un grupo amino en la cadena lateral, y esta estructura se puede unir a Lg para formar una estructura conectora conectada al mismo número de sustancias de azúcar que el número de grupos amino. Por ejemplo, se pueden hacer reaccionar una pluralidad de grupos amino en tal péptido ramificado con cadenas glucídicas que tienen grupos carboxilo, por ejemplo, mediante el uso de un agente de condensación tal como HATU, para introducir una pluralidad de cadenas glucídicas a través del péptido ramificado. Algunos ejemplos del péptido modificado producido de ese modo incluyen estructuras conectoras tales como "SG-[SG-(SG-)Lys-]Lys" y "SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys-]Lys". Algunos ejemplos específicos de tal péptido modificado pueden incluir los compuestos 2-14 y 2-35.

El aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga al menos un grupo SH en la cadena lateral. El aminoácido natural que tiene un grupo SH en la cadena lateral es Cys. Algunos ejemplos de aminoácidos artificiales que tienen un grupo SH en la cadena lateral puede incluir aminoácidos alterados que contienen grupos SH obtenidos a partir de la reacción de un compuesto que tiene, por ejemplo, una estructura HOOC-R-STr (sulfuro de tritilo) con el grupo amino de cadena lateral de Lys o mediante la reacción de un compuesto que tiene, por ejemplo, una estructura H₂N-R-STr con el grupo carboxilo de cadena lateral de Glu o Asp.

Cuando la estructura conectora contiene al menos un aminoácido que tiene un grupo SH en la cadena lateral y la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo SH en la cadena lateral, se puede tomar una estructura parcial de la siguiente fórmula general:

[Fórmula 33]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; S representa un átomo de azufre obtenido a partir del grupo SH de cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo SH en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo SH de cadena lateral.

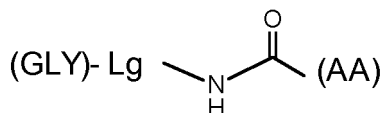
La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir por reacción del aminoácido que tiene el grupo SH en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido con una molécula conectora representada por (GLY)-Lg-N maleimida. En esta reacción, el aminoácido que tiene el grupo SH en la cadena lateral puede estar conectado en su grupo amino α y/o grupo carboxilo α a otra sustancia de azúcar, formando de ese modo una estructura conectora que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, se pueden introducir una pluralidad de cadenas glucídicas a través de tal péptido ramificado mediante: reacción de una pluralidad de grupos amino en el péptido ramificado con ácido 3-mercaptopropiónico que tiene un grupo SH protegido; desprotección del extremo C-terminal del péptido; después de unirse al péptido hANP, desprotección del grupo SH; y reacción con el mismo de cadenas glucídicas que tienen grupos maleimida en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,75). Algunos ejemplos específicos de tal compuesto incluyen los compuestos 2-19, 2-20, y 2-23.

En una producción similar, se puede producir un péptido modificado que tiene una estructura parcial en la que el péptido hANP está conectado a la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo SH en la cadena lateral mediante el reemplazo de Lg(-sustancia de azúcar) con Lp(-péptido hANP). Además, se puede producir de forma apropiada un péptido modificado que contiene una pluralidad de sustancias de azúcar y/o una pluralidad de péptidos hANP en una molécula mediante el uso combinado con otras moléculas conectoras que tienen diversas estructuras.

El aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga al menos un grupo carboxilo en la cadena lateral. Los aminoácidos naturales que tienen un grupo carboxilo en la cadena lateral son Asp o Glu. Algunos ejemplos de un aminoácido artificial que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral pueden incluir aminoácidos alterados obtenidos por reacción de un ácido carboxílico divalente tal como ácido maleico con el grupo amino de cadena lateral de Lys.

Cuando la estructura conectora contiene al menos un aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral y la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, se puede tomar una estructura parcial de la siguiente fórmula general:

[Fórmula 34]



5 en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; CO representa CO obtenido a partir de la cadena lateral del aminoácido que tiene ácido carboxílico en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo ácido carboxílico de cadena lateral.

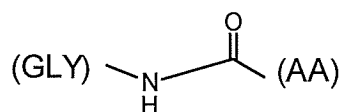
10 La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir introduciendo, si fuera necesario, un grupo protector en el grupo amino del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido, haciendo reaccionar posteriormente con el mismo una molécula conectora representada por "Lg-NH₂", desprotegiendo después el grupo amino, y uniendo el compuesto resultante a Lg o el extremo C-terminal del péptido hANP. En esta reacción, cuando el aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la
15 cadena lateral tiene un grupo carboxilo α libre, Lg puede formar una estructura conectora que tiene una estructura ramificada a través de enlaces amida tanto al grupo carboxilo de cadena lateral como al grupo carboxilo α. Por ejemplo, se pueden introducir una pluralidad de cadenas glucídicas a través de tal péptido ramificado activando los ácidos carboxílicos del péptido ramificado que tiene una pluralidad de grupos carboxilo mediante el uso de anhídrido trifluoroacético y N-hidroxisuccinimida y haciendo reaccionar con el mismo cadenas glucídicas (SG-NH₂, etc.) que
20 tienen grupos amino. Tal estructura parcial en la que se usa Glu como aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral y está conectada a SG se representa mediante, por ejemplo, "-(SG(Lg)-)Gln-(Lg) SG" (en la que Glu y Asp tienen la misma estructura que Gln/Asn debido a que sus cadenas laterales forman enlaces amida). Algunos ejemplos específicos de tal péptido modificado pueden incluir los compuestos 2-31 y 2-32.

25 En una producción similar, se puede producir un péptido modificado que tiene una estructura parcial en la que el péptido hANP está conectado a la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral mediante el reemplazo de Lg(sustancia de azúcar) con Lp(péptido hANP). La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir introduciendo, si fuera necesario, un grupo protector en el grupo amino del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido, haciendo reaccionar posteriormente con el mismo una molécula conectora representada por "(hANP)-
30 Lp-NH₂", desprotegiendo después el grupo amino, y uniendo el compuesto resultante a Lg que tiene un grupo funcional adecuado. En esta reacción, cuando el aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral tiene un grupo carboxilo α libre, Lp puede formar una estructura conectora que tiene una estructura ramificada a través de enlaces amida tanto al grupo carboxilo de cadena lateral como al grupo carboxilo α. Por ejemplo, se puede producir un péptido modificado polivalente de hANP en el que se introducen una pluralidad de péptidos hANP a través de tal péptido ramificado mediante la activación de los ácidos carboxílicos del péptido ramificado que tiene una pluralidad de
35 grupos carboxilo mediante el uso de anhídrido trifluoroacético y N-hidroxisuccinimida y reacción con el mismo de Lp que tiene grupos amino o los grupos amino N-terminales de los péptidos hANP. Tal estructura parcial en la que se usa Glu como el aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral y está conectada a hANP se representa mediante, por ejemplo, "SG Gln-(Lp-hANP)₂" (en la que Glu y Asp tienen la misma estructura que Gln/Asn debido a que sus cadenas laterales forman enlaces amida). Además, se puede producir de forma apropiada un péptido modificado que contiene una pluralidad de sustancias de azúcar y/o una pluralidad de péptidos hANP en una molécula mediante el uso combinado con otras moléculas conectoras que tienen diversas estructuras.

45 Como alternativa, se puede formar una estructura que tiene un gran número de grupos carboxilo mediante la formación repetida de los enlaces amida respectivos del grupo carboxilo de cadena lateral y el grupo carboxilo α de cada aminoácido que tiene un grupo carboxilo en la cadena lateral con los grupos amino α de otros aminoácidos (que pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes y es preferente que sean del mismo tipo) que tienen un grupo carboxilo en la cadena lateral, y esta estructura se puede unir a Lg a través de la reacción mencionada anteriormente para formar una estructura conectora conectada al mismo número de Lg que el número de grupos carboxilo. Tal estructura parcial de la estructura conectora es, por ejemplo, "H-[(SG-)Gln-SG]Gln-SG".

50 El grupo carboxilo del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral se puede conectar además directamente a la sustancia de azúcar a través de un enlace N-glucosídico para formar la siguiente estructura parcial:

[Fórmula 35]



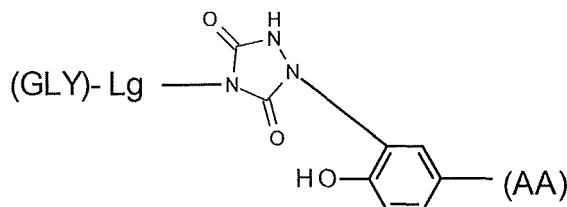
en la que GLY representa la sustancia de azúcar; NH-CO-(AA) representa una estructura de amida obtenida a partir de la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo ácido carboxílico de cadena lateral.

5 Tal estructura parcial se puede producir por reacción del aminoácido que tiene ácido carboxílico en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido con una sustancia de azúcar azidada en el extremo reductor en presencia de trifetilfosfina, y unión del extremo reductor de la sustancia de azúcar a la cadena lateral a través de un enlace N-glucosídico. Además, se puede sintetizar un compuesto que tiene una estructura en la que la sustancia de azúcar está conectada al grupo carboxilo α del aminoácido que tiene el grupo carboxilo en la cadena lateral mediante un procedimiento basado en los Ejemplos. Algunos ejemplos específicos de tal péptido modificado con azúcar incluyen los compuestos 2-3, 2-4, 2-8, 2-9, 2-13, 2-21,2-22, 2-27,2-28, 2-38, y 2-39.

10 El aminoácido que tiene un grupo fenol en la cadena lateral no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga al menos un grupo p-fenol en la cadena lateral. El aminoácido natural que tiene un grupo fenol en la cadena lateral es Tyr. Algunos ejemplos de un aminoácido artificial que tiene un grupo fenol en la cadena lateral pueden incluir aminoácidos alterados obtenidos por reacción de p-aminofenol con el grupo carboxilo de cadena lateral de Glu o Asp.

15 Cuando la estructura conectora contiene al menos un aminoácido que tiene un grupo fenol en la cadena lateral y la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral de este aminoácido, se puede tomar una estructura parcial de la siguiente fórmula general:

[Fórmula 36]



20 en la que GLY representa la sustancia de azúcar; Lg representa una estructura en el lado de la cadena glucídica en la estructura conectora y puede ser lineal o tener dos o más ramificaciones; GLY y L están unidos a través de un enlace O- o N-glucosídico; cuando Lg está ramificado, hay el mismo número de GLY que el número de extremos de ramificación que son capaces de conectarse a ello; el grupo fenol representa un grupo fenol obtenido a partir de la cadena lateral del aminoácido que tiene fenol en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo fenol de cadena lateral.

25 La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir por reacción del aminoácido que tiene el grupo fenol en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido con una molécula conectora representada por (GLY)-Lg-N triazoldiona(*). En esta reacción, el aminoácido que tiene el grupo fenol en la cadena lateral se puede conectar en su grupo amino α y/o grupo carboxilo α a otra sustancia de azúcar, formando de ese modo una estructura conectora que tiene una estructura ramificada. Por ejemplo, se puede introducir selectivamente una estructura GlcNAc en la cadena lateral fenólica de Tyr que corresponde a la posición 28 de hANP por activación de GlcNAc que tiene una estructura de triazoldiona mediante el uso de N-bromosuccinimida, y reacción con la misma de hANP. Se puede realizar una reacción de transglucosilación con este compuesto como material de partida. Algunos ejemplos específicos de tal compuesto incluyen el compuesto 2-6.

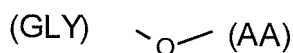
35 En una producción similar, se puede producir un péptido modificado que tiene una estructura parcial en la que el péptido hANP está conectado a la cadena lateral del aminoácido que tiene el grupo fenol en la cadena lateral mediante el reemplazo de Lg(sustancia de azúcar) con Lp(péptido hANP). Además, se puede producir de forma apropiada un péptido modificado que contiene una pluralidad de sustancias de azúcar y/o una pluralidad de péptidos hANP en una molécula mediante el uso combinado con otras moléculas conectoras que tienen diversas estructuras.

40 El aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral no se limita de forma particular siempre que el aminoácido tenga al menos un grupo hidroxilo en la cadena lateral. Un aminoácido natural que tiene un grupo hidroxilo

en la cadena lateral es Ser o Tyr. Algunos ejemplos de un aminoácido artificial que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral pueden incluir aminoácidos alterados obtenidos por la reacción de un aminoalcohol tal como 2-aminoetanol con el ácido carboxílico de cadena lateral de Asp o Glu.

5 Cuando la estructura conectora contiene al menos un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral y la sustancia de azúcar está conectada a la cadena lateral de este aminoácido, se puede tomar una estructura parcial de la siguiente fórmula general:

[Fórmula 37]



en la que GLY representa la sustancia de azúcar; O representa un átomo de oxígeno obtenido a partir del grupo hidroxilo de cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral; y (AA) contiene la estructura básica del aminoácido y un resto estructural conectado al grupo hidroxilo de cadena lateral.

10 La estructura conectora que tiene tal estructura parcial se puede producir por reacción del aminoácido que tiene el grupo hidroxilo en la cadena lateral o una molécula conectora que contiene este aminoácido con la sustancia de azúcar en condiciones que formen un enlace O-glucosídico. En esta reacción, el aminoácido que tiene el grupo hidroxilo en la cadena lateral puede estar conectado en su grupo amino α y/o α . Por ejemplo, se puede introducir GlcNAc en la cadena lateral de serina a través de un enlace O-glucosídico por reacción de un derivado de glucosamina que tiene una estructura de tricloroacetimidato con el grupo hidroxilo de cadena lateral de la serina en presencia de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo, seguido de varias etapas. Se pueden realizar reacciones de transglucosilación con este compuesto como material de partida. Algunos ejemplos específicos de tal péptido modificado incluyen el compuesto 2-5.

20 En una producción similar, se puede producir un péptido modificado que tiene una estructura parcial en la que el péptido hANP está conectado a la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral mediante el reemplazo de Lg(sustancia de azúcar) con Lp(péptido hANP). Además, se puede producir de forma apropiada un péptido modificado que contiene una pluralidad de sustancias de azúcar y/o una pluralidad de péptidos hANP en una molécula mediante el uso combinado con otras moléculas conectoras que tienen diversas estructuras.

25 Se pueden conectar al menos el mismo número de sustancias de azúcar que el número de estas cadenas laterales que contienen grupos funcionales a través de diversas reacciones mencionadas anteriormente usando una molécula conectora que contiene un oligopéptido que contiene una pluralidad de tales aminoácidos que tienen la estructura de cadena lateral o una pluralidad de moléculas conectoras que contienen cada una uno o más de cada uno de estos aminoácidos. Tal oligopéptido no se limita de forma particular siempre que el oligopéptido comprenda los aminoácidos mencionados anteriormente que tienen la cadena lateral. El oligopéptido puede contener además cierto número de Gly y preferentemente tiene una secuencia de repetición en la que estos restos de Gly se disponen regularmente. Cuando el aminoácido que tiene la cadena lateral se define como, por ejemplo, Xaa, es preferente un oligopéptido representado por $(Xaa-Gly_m)_n$ (en la que m y n representan cada uno independientemente un número natural de 1 o mayor). Aunque no existen límites superiores particulares para n y m, cada uno de n y m es preferentemente 10 o menos, más preferentemente 7 o menos. Incluso más preferentemente, m es 3 o menos. Algunos ejemplos específicos del oligopéptido pueden incluir, pero no se limitan a, $(Cys-Gly)_3$, $(Cys-Gly)_5$, $(Lys-Gly-Gly)_3$, y $(Tyr-Gly-Gly-Gly)_3$. Algunos ejemplos específicos del péptido modificado que tiene tal estructura pueden incluir los compuestos 2-15, 2-17, y 2-18.

40 Se pueden unir diversas moléculas conectoras y compuestos de GlcNAc que se han descrito anteriormente mediante una combinación apropiada para sintetizar una estructura conectora que tenga una estructura diseñada según necesidades. Tales estructuras conectoras se pueden diseñar como estructuras muy diversas y también se puede controlar el número de sustancias de azúcar que se une. Se pueden producir numerosas variaciones de péptidos modificados mediante tales diseño y síntesis.

<Procedimiento de producción y compuesto de GlcNAc>

45 En la presente invención, el péptido modificado en el que la sustancia de azúcar está unida a través de un enlace O-glucosídico a la estructura conectora se puede producir por reacción de GlcNAc-oxa (o su sustancia relacionada, por ejemplo, en la que se protegen tres grupos hidroxilo contenidos en el resto de GlcNAc por acetilación), que es un derivado de oxazolona de N-acetilglucosamina (GlcNAc), con una molécula conectora que tiene un grupo hidroxilo (por ejemplo, glicolato de bencilo o un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral, tal como serina o tirosina). Además, se puede producir el péptido modificado en el que la sustancia de azúcar está unida a través de un enlace N-glucosídico a la estructura conectora por reacción de una sustancia de azúcar que tiene un grupo azida con una molécula conectora que tiene un grupo carboxilo en presencia de trifenilfosfina.

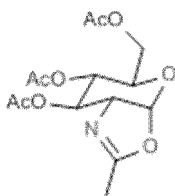
50 En el péptido modificado de la presente invención, en el caso de conectar una sustancia de azúcar que tiene una estructura de cadena glucídica como sustancia de azúcar, el extremo reductor de la cadena glucídica se puede

modificar y unir de forma apropiada a la molécula conectora. Como alternativa, se puede sintetizar un compuesto aceptor que tiene una unidad de azúcar particular y una estructura deseada (por ejemplo, un compuesto de GlcNAc), y también se puede producir el péptido modificado mediante la transferencia de una cadena glucídica a la unidad de azúcar (por ejemplo, GlcNAc) mediante el uso de una glicosintasa (por ejemplo, Endo-M N175Q).

- 5 En la presente invención, un "compuesto de GlcNAc" es un compuesto que contiene GlcNAc que no experimenta una modificación excepto el enlace glucosídico en el carbono de la posición 1, y los grupos funcionales capaces de unirse a otras moléculas, o un compuesto conectado al péptido hANP. El compuesto de GlcNAc puede ser, por ejemplo, un compuesto en el que GlcNAc como monosacárido está unido a través de un enlace glucosídico a un compuesto deseado, aminoácido, o similar en una molécula, una cadena glucídica (por ejemplo, AG(5)) que tiene
10 GlcNAc en el extremo no reductor, o un compuesto unido a ello. El enlace glucosídico entre el compuesto y GlcNAc puede tener cualquiera de la posición α o la posición β , promoviendo ambas la reacción de transferencia (Endoglicosidasas: Masahiko Endo, y col., Biochemistry, Biotechnology, Application). Para la estructura de cadena glucídica después de una transferencia con respecto a una cadena glucídica natural, es preferente tener el mismo patrón de unión que en la cadena glucídica de origen natural. Por ejemplo, cuando el compuesto unido a azúcar
15 después de la transferencia tiene SG, la posición β es también preferente para el compuesto de GlcNAc como aceptor del SG.

El compuesto de GlcNAc se puede producir de acuerdo con diversos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, glucosamina o 4,5-dihidro-2-metiloxazolo[5',4':1,2]-3,4,6-tri-O-acetil-1,2-didesoxi- α -glucopiranososa (la siguiente fórmula; véase Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485-500):

[Fórmula 38]



- 20 se puede usar como material de partida para sintetizar un compuesto que tiene una estructura y un grupo funcional deseados de forma apropiada. Algunos ejemplos específicos de tal compuesto de GlcNAc pueden incluir el compuesto 1-2C que tiene un grupo carboxilo, el compuesto 1-7A que tiene un grupo amino, y el compuesto 1-6D que tiene un grupo triazolidiona. Además, se puede sintetizar el compuesto de GlcNAc compuesto en el que está
25 conectado un aminoácido a GlcNAc mediante la adición selectiva de un grupo protector a cualquiera del grupo amino o el grupo carboxilo. Algunos ejemplos específicos del mismo pueden incluir Boc-(GlcNAc-)Ser (compuesto 1-1D), Boc-(GlcNAc-)Asn (J. Am. Chem. Soc., 1999, 121,284-290), y (GlcNAc-)Gln.

- El compuesto de GlcNAc como se ha descrito anteriormente se puede unir a otra molécula conectora o al péptido para sintetizar compuestos de GlcNAc que tienen diversas estructuras y grupos funcionales de conexión. Tales compuestos de GlcNAc diversos se pueden usar en la producción del péptido modificado de la presente invención.
30 Por ejemplo, se puede unir un compuesto de GlcNAc que tiene un grupo amino (o un grupo carboxilo) a una molécula conectora que tiene un grupo carboxilo (o un grupo amino) y una estructura y un grupo funcional adecuados con el fin de sintetizar un compuesto de GlcNAc que tiene el grupo funcional deseado (ejemplos específicos: compuesto 1-7B que tiene un grupo maleimida).

- Por ejemplo, se puede unir un compuesto de GlcNAc que tiene un grupo amino (o un grupo carboxilo) a una
35 molécula conectora de PEG que tiene un grupo carboxilo (o un grupo amino) para sintetizar un compuesto de GlcNAc que tiene una longitud deseada de PEG (ejemplos específicos: compuestos 1-3A, 1-4B, 1-5A, y 1-19). Como alternativa, se puede usar una poliamida tal como poliGly o poli(Ser-Gly) en lugar de PEG para sintetizar un compuesto de GlcNAc que tiene una longitud deseada de conector de poliamida (ejemplos específicos: compuesto 1-21B). En este contexto, se puede adoptar un aminoácido que tiene un grupo funcional en la cadena lateral como el
40 aminoácido contenido en la poliamida para unir un compuesto de GlcNAc adicional al grupo funcional.

- El compuesto de GlcNAc que se usa en la presente invención puede ser un compuesto que contiene una pluralidad de restos de GlcNAc individuales en una molécula. Algunos ejemplos de tal compuesto de GlcNAc polivalente incluyen compuestos en los que dos restos de GlcNAc están unidos a través de enlaces N-glucosídicos al aminoácido mencionado anteriormente, y compuestos en los que una pluralidad de los compuestos de GlcNAc
45 mencionados anteriormente están unidos a la molécula conectora. Por ejemplo, un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral, tal como Lys se puede hacer reaccionar como molecular conectora con 2 equivalentes de un compuesto de GlcNAc que tiene un grupo carboxilo para sintetizar un compuesto de GlcNAc que tienen dos restos de GlcNAc y un grupo carboxilo, tal como GlcNAc-(GlcNAc-)Lys-OH. Este GlcNAc-(GlcNAc-)Lys-OH se puede hacer reaccionar además con lisina (un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral) para sintetizar un
50 compuesto de GlcNAc tetravalente. Esta etapa se puede repetir para sintetizar un compuesto de GlcNAc que

contiene un gran número de restos de GlcNAc. Cuando el compuesto de GlcNAc tiene una pluralidad de grupos funcionales, también se puede sintetizar un compuesto de GlcNAc polivalente (ejemplos específicos: compuesto 1-5B) por introducción de un grupo protector en una parte de estos grupos funcionales, conexión de GlcNAc a ello, después desprotección de los grupos funcionales, y unión de compuestos de GlcNAc adicionales a los grupos funcionales desprotegidos. Estos enfoques se pueden repetir y/o combinar de forma apropiada de acuerdo con procedimientos convencionales para sintetizar diversos compuestos de GlcNAc.

Los compuestos obtenidos a partir del compuesto de GlcNAc mediante el reemplazo de GlcNAc como en la definición, forma, etc. anteriores, con Glc o Man se definen como un compuesto de Glc y un compuesto de Man, respectivamente. Estos compuestos también se adoptan preferentemente como el compuesto aceptor para la producción del péptido modificado de la presente invención.

En la producción del péptido modificado de la presente invención, el péptido modificado se puede producir mediante la unión, transferencia, etc., apropiada de compuestos intermedios (hANP, sustancia de azúcar, molecular conectora, compuesto aceptor, etc.). El orden en el que se producen estos compuestos intermedios no se limita de forma particular, y los compuestos intermedios se pueden producir mediante diversos procedimientos de acuerdo con procedimientos convencionales. El grupo funcional portado por cada compuesto intermedio se somete de forma apropiada a activación, desactivación, adición de un grupo protector, desprotección, etc., de acuerdo con procedimientos convencionales dependiendo del procedimiento de producción.

La sustancia de azúcar se puede conectar mediante la adopción de diversos procedimientos. Por ejemplo, se transfiere una cadena glucídica a una molécula de conector que tiene GlcNAc, Glc, o similar, y esta molécula conectora unida a cadena glucídica se puede conectar al péptido hANP. Como alternativa, se puede usar un compuesto intermedio en el que Glc o GlcNAc está unida al péptido hANP como compuesto aceptor para la transferencia de una cadena glucídica en la producción del péptido modificado. El grupo hidroxilo portado por la sustancia de azúcar se puede someter de forma apropiada a etapas tales como acetilación y desacetilación y evitar causar de ese modo reacciones secundarias innecesarias.

<Función y actividad>

El péptido modificado de la presente invención exhibe un tiempo de duración prolongado en sangre y una excelente solubilidad en agua en comparación con hANP(1-28) sin modificar y mantiene actividad de elevación de GMPc. hANP(1-28) desaparece rápidamente de la sangre y por lo tanto necesita administrarse continuamente en la práctica clínica. Por el contrario, el péptido modificado de la presente invención puede ejercer efectos farmacológicos incluso mediante administración no continua. Además, el péptido modificado de la presente invención es superior en solubilidad en agua con respecto al hANP nativo y por lo tanto es aplicable a una formulación que contiene un principio activo a una concentración elevada. Tales características del péptido modificado de la presente invención permiten la adopción de procedimientos de administración, rutas de administración, y técnicas de formulación, que no se pueden conseguir con hANP nativo convencional, y también permiten que el péptido modificado se use en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares agudas así como enfermedades cardiovasculares crónicas (hipertensión, enfermedades cardíacas crónicas, etc.). Además, el péptido modificado de la presente invención también es útil como herramienta de investigación biológica. No está clara la forma en que el hANP nativo migra, si lo hiciera, a un tejido cuando reside en la sangre durante un periodo prolongado. Por el contrario, tal ubicación o la influencia de la residencia a largo plazo de hANP en la sangre en cuerpos vivos se puede examinar mediante la administración del péptido modificado de la presente invención. El tiempo de duración del péptido modificado de la presente invención en sangre se puede someter a ensayo de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo de ensayo 3 por administración del péptido modificado a un animal y después detección de la concentración de GMPc en sangre periférica y/o el péptido modificado contenido en la muestra de sangre periférica. El péptido modificado de la presente invención mantiene el efecto de elevar la concentración de GMPc en sangre periférica incluso aproximadamente 15 minutos después de administración intracorpórea, más preferentemente mantiene este efecto incluso aproximadamente 30 minutos después de la administración, incluso más preferentemente mantiene este efecto incluso aproximadamente 45 minutos después de la administración, y además preferentemente mantiene este efecto incluso aproximadamente 60 minutos después de la administración. En cuanto a la detección del péptido modificado a partir de sangre periférica después de la administración del péptido modificado, este péptido se detecta preferentemente incluso aproximadamente 30 minutos después, más preferentemente incluso aproximadamente 45 minutos después, incluso más preferentemente incluso aproximadamente 60 minutos después, además preferentemente incluso aproximadamente 90 minutos después.

El péptido modificado de la presente invención exhibe una excelente solubilidad en agua en virtud de la sustancia de azúcar conectada. Esta excelente solubilidad en agua también se ve influida por la estructura química de la estructura conectora. La cantidad de hANP nativo disuelto por ml de agua es 32 mmol, momento en el que el péptido gelifica. Por el contrario, 60 mmol o más, preferentemente 80 mmol o más, más preferentemente 100 mmol (por ejemplo, específicamente, 112 mmol) del péptido modificado de la presente invención es soluble por ml de agua. De ese modo, el péptido modificado de la presente invención tiene aproximadamente 2 o más veces, preferentemente aproximadamente 3 o más veces la solubilidad en agua del hANP nativo.

El tiempo de duración en sangre del péptido modificado de la presente invención se puede medir por administración

del péptido modificado a un organismo, extracción de una muestra de sangre a ciertos intervalos de tiempo, y detección del péptido modificado contenido en las muestras de sangre. Se pueden usar diversos procedimientos, por ejemplo, detección mediante LC-MS y ELISA usando un anticuerpo que reconoce específicamente la estructura de anillo de hANP, como procedimientos para detectar el péptido modificado. En el caso de administrar el péptido modificado de la presente invención a una dosis que produce su actividad de elevación de GMPc, los niveles de GMPc de las muestras de sangre se miden mediante el uso de un kit de medición disponible en el mercado y se comparan con el nivel de GMPc en sangre determinado antes del comienzo de la administración. De esta forma, se puede medir el tiempo de duración del péptido modificado en sangre como actividad biológica. Como alternativa, el péptido modificado se puede etiquetar con un radioisótopo y detectar por separación de las muestras de sangre mediante SDS-PAGE o similar y detección de las señales radiactivas.

En la presente invención, el "tiempo de duración prolongada en sangre" significa que el péptido modificado exhibe un tiempo de duración mayor en sangre que el del hANP nativo. El hANP nativo administrado por vía subcutánea a un mono ya no se detecta en sangre 30 minutos después de la administración. Por lo tanto, si el péptido modificado se puede detectar 30 minutos después de la administración, su tiempo de duración en sangre se puede considerar como prolongado. Además, la elevación del nivel de GMPc en sangre por parte del hANP nativo administrado por vía subcutánea a un mono vuelve, 60 minutos después de la administración, al mismo nivel que antes de la administración. Por lo tanto, si el péptido modificado exhibe, 60 minutos después de la administración, un nivel de GMPc mayor que el de antes de la administración, su tiempo de duración en sangre se puede considerar como prolongado.

El péptido modificado de la presente invención también tiene resistencia a la degradación del péptido hANP mediante NEP. Esto se debe probablemente en parte en respuesta al tiempo de duración prolongado. Tal resistencia a la degradación con NEP se puede medir mediante un procedimiento conocido en la técnica.

La actividad de elevación de GMPc del péptido modificado de la presente invención se puede medir por estimulación de células que expresan receptores GC-A con una sustancia de ensayo preparada con un gradiente de concentración hasta una cantidad suficiente para proporcionar la actividad máxima, después lisado de las células, medición de las concentraciones de GMPc en los lisados celulares, e identificación de la concentración máxima de GMPc (Emax). La expresión "mantener la actividad de elevación de GMPc" que se describe para el péptido modificado de la presente invención significa que la concentración máxima de GMPc exhibida por el péptido modificado es aproximadamente un 30 % o más en comparación con la concentración máxima de GMPc del hANP nativo. La concentración máxima de GMPc exhibida por el péptido modificado es preferentemente aproximadamente un 50 % más, más preferentemente aproximadamente un 70 % más. El péptido modificado de la presente invención se puede formular a una concentración elevada en comparación con el péptido hANP nativo y exhibe un tiempo de duración prolongado en sangre. A este respecto, no es apropiado definir la actividad del péptido modificado de la presente invención basándose en un índice tal como los denominados valores CE50. Si la actividad máxima de un péptido modificado a la concentración elevada puede ser una actividad mayor o igual que un cierto nivel de actividad de hANP nativo, el péptido modificado puede presentar suficiente eficacia cuando se administra de forma continua y/o a alta concentración en la práctica clínica.

La presente invención proporciona un medicamento que comprende el péptido modificado de la presente invención como principio activo.

<Medicamento>

La sustancia que se puede usar como principio activo para el medicamento de acuerdo con la presente invención puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del péptido modificado mencionado anteriormente. Específicamente, en la presente invención, se puede usar una sal de adición de ácido (un ácido inorgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico, o un ácido orgánico, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido butírico, ácido trifluoroacético (TFA), ácido succínico, o ácido cítrico) de la sustancia como principio activo. Como alternativa, en la presente invención, se puede usar una sal de un metal (por ejemplo, sodio, potasio, litio, o calcio) de la sustancia o una forma de sal basada en una base orgánica de la misma como principio activo. Tal sal del péptido modificado de la presente invención puede ser una sal basada en el resto de péptido hANP o puede ser una sal formada en la estructura de la sustancia de azúcar. La sal del péptido modificado de la presente invención es preferentemente una sal farmacéuticamente aceptable formada en el resto de péptido hANP, más preferentemente un trifluoroacetato o un acetato formado en el resto de péptido hANP. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener una forma libre de la sustancia relacionada con el principio activo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La sustancia que se puede usar como principio activo para el medicamento de acuerdo con la presente invención, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se mezcla preferentemente con un vehículo, excipiente, diluyente, o similar, farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica y se administra a un individuo mediante un procedimiento de administración usado generalmente para medicamentos, es decir, un procedimiento de administración oral o un procedimiento de administración parenteral tal como administración transmucosa, administración intravenosa, administración intramuscular, o administración subcutánea.

La dosis de la sustancia que se puede usar como principio activo para el medicamento de acuerdo con la presente invención difiere dependiendo del tipo de enfermedad, la edad, peso corporal, y gravedad de la afección del individuo (paciente), y la ruta de administración, etc. En general, el límite superior de la dosis diaria es, por ejemplo, aproximadamente 100 mg/kg o inferior, preferentemente aproximadamente 50 mg/kg o inferior, más preferentemente 1 mg/kg o inferior. El límite inferior de la dosis diaria es, por ejemplo, aproximadamente 0,1 µg/kg o superior, preferentemente 0,5 µg/kg o superior, más preferentemente 1 µg/kg o superior.

La frecuencia de administración del medicamento de acuerdo con la presente invención varía dependiendo del principio activo usado, la ruta de administración, y la enfermedad particular que se trata. En el caso de administración por vía oral, por ejemplo, de una sustancia peptídica, esta sustancia se prescribe preferentemente de un modo tal que el número de dosis por día sea 4 o inferior. El caso de administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, el medicamento se puede inyectar mediante el uso de una jeringa normal o se puede administrar de forma continua mediante el uso de una bomba de infusión, un catéter, o similar. Como alternativa, también es preferente la administración a través de una ruta tal como inyección subcutánea o inyección intramuscular. En este caso, se pueden adoptar diversos dispositivos de administración que se usan habitualmente.

Cuando el principio activo para el medicamento de la presente invención se prepara en una solución, el péptido modificado de la presente invención o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede disolver en un disolvente acuoso y complementarse, si fuera necesario, con un estabilizante, un agente para ajustar el pH, un tensoactivo, y similar para preparar la solución. Cuando el principio activo se prepara en una formulación liofilizada, la solución preparada de ese modo se puede liofilizar y disolver en solución salina fisiológica, agua para inyección, o una solución de glucosa en uso.

El medicamento de la presente invención se administra a un paciente con una enfermedad que es tratable mediante la activación de GC-A y la elevación resultante del nivel de GMPc, y de ese modo es eficaz para tratar tal enfermedad. En este contexto, el "tratamiento" de la enfermedad o sus síntomas significa que se retrasa, alivia, reduce, y/o suprime el progreso de una afección patológica que se espera que se normalice mediante la activación de GC-A, haciendo de ese modo la afección más próxima a un estado normal. El medicamento de la presente invención se espera que sea eficaz para prevenir el empeoramiento o el comienzo de una enfermedad mediante el inicio de su administración en una etapa temprana de la enfermedad o a un individuo con alto riesgo de la enfermedad. Aunque un paciente que ha desarrollado la enfermedad en el pasado se encuentra en riesgo de reaparición o cronicidad, se puede esperar que el medicamento de la presente invención reduzca el riesgo de reaparición o cronicidad mediante administración continua a tal paciente. Estos efectos también se incluyen en el ámbito del tratamiento.

Algunos ejemplos de tal enfermedad incluyen hipertensión, insuficiencia cardíaca aguda (incluyendo la gestión de una afección médica después del comienzo de la insuficiencia cardíaca aguda), insuficiencia cardíaca crónica, enfermedades cardíacas isquémicas, nefritis aguda (incluyendo la gestión de una afección médica después del comienzo de la nefritis aguda), nefritis crónica, insuficiencia renal aguda (incluyendo la gestión de una afección médica después del comienzo de la insuficiencia renal aguda), insuficiencia renal crónica, enfermedades cardíacas isquémicas (infarto de miocardio, etc.), metástasis de tumor maligno, fibrosis hepática, cirrosis hepática, adhesión tisular causada por diálisis, y fibrosis.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente por referencia a Ejemplos. Las realizaciones de la presente invención que se describen en los Ejemplos se dan meramente con fines ilustrativos, y la presente invención no pretende quedar limitada por estos ejemplos.

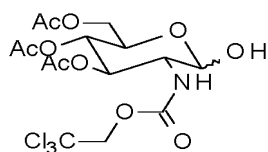
El Ejemplo 1 es un ejemplo de producción de una molécula conectora, un compuesto de GlcNAc compuesto, una sustancia de azúcar, o un derivado de la misma, que es un compuesto intermedio para la producción del péptido modificado de la presente invención. El Ejemplo 2 es un ejemplo de producción del péptido modificado usando estos compuestos intermedios. Los Ejemplos de ensayo son ejemplos de ensayos de las características o los efectos del péptido modificado de la presente invención.

[Ejemplo 1]

<Ejemplo 1-1>

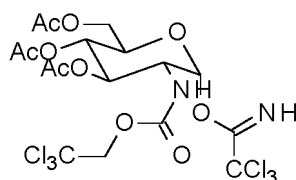
(1-1A) Síntesis de acetato de [(2R,3S,4R,5R,6R)-3,4-diacetoxi-6-hidroxi-5-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)tetrahidro-piran-2-il]metilo (compuesto 1-1A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 39]



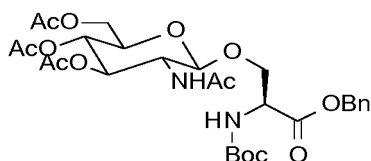
- Se disolvieron en agua clorhidrato de glucosamina (10,0 g, 46,38 mmol) y bicarbonato sódico (11,7 g, 139 mmol) (100 ml). A la solución, se añadió gota a gota cloroformiato de 2,2,2-tricloroetilo (7,66 ml, 55,7 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se neutralizó mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N, y los precipitados resultantes se recogieron por filtración. El sólido se lavó con agua y después se secó en una bomba de vacío. El sólido obtenido se disolvió en piridina (50 ml). A la solución, se añadió anhídrido acético (24,1 ml, 255 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante una noche. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 80:20 - 33:67, v/v) para obtener un producto en bruto del compuesto intermedio en forma de un aceite incoloro (19,4 g).
- 10 El producto en bruto obtenido (19,4 g) del compuesto intermedio se disolvió en N,N-dimetilformamida (200 ml). A la solución, se añadió a temperatura ambiente acetato de hidrazina (4,01 g, 44,5 mmol), y la mezcla se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución salina al 10 % dos veces y solución salina saturada una vez. Después de secar sobre sulfato sódico anhidro y filtrar, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 80:20 - 25:75, v/v) para obtener el compuesto del título 1-1A en forma de un sólido de color blanco (11,6 g, rendimiento en 2 etapas: 52 %).
- 15 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 5,42 (1H, d, J = 9,8 Hz), 5,37-5,32 (2H, m), 5,16-5,10 (1H, m), 4,80 (1H, d, J = 11,7 Hz), 4,64 (1H, d, J = 12,1 Hz), 4,26-4,22 (2H, m), 4,17-4,12 (1H, m), 4,09-4,03 (1H, m), 3,46-3,43 (1H, m), 2,10 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,02 (3H, s).
- 20 (1-1B) Síntesis de acetato de [(2R,3S,4R,5R,6S)-3,4-diacetoxi-6-(2,2,2-tricloroetanimidooil)oxi-5-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)tetrahidropiran-2-il]metilo (compuesto 1-1B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 40]



- El compuesto 1-1A (5,00 g, 10,4 mmol) se disolvió en diclorometano (35 ml). A la solución, se añadieron tricloroacetoneitrilo (10,4 ml, 104 mmol) y diazabicycloundeceno (0,467 ml, 3,12 mmol) a 0 °C. La solución de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 40 minutos. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 75:25 - 50:50, v/v) para obtener el compuesto del título 1-1B en forma de un aceite incoloro (3,70 g, rendimiento: 57%).
- 25 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8,81 (1H, s), 6,43 (1H, d, J = 3,9 Hz), 5,37-5,34 (1H, m), 5,27-5,22 (2H, m), 4,72 (2H, dd, J = 16,2, 11,9 Hz), 4,32-4,26 (2H, m), 4,16-4,10 (2H, m), 2,09 (3H, s), 2,06 (6H, s).

(1-1C) Síntesis de (2S)-3-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoato de bencilo (compuesto 1-1C: compuesto de la siguiente fórmula) [Fórmula 41]

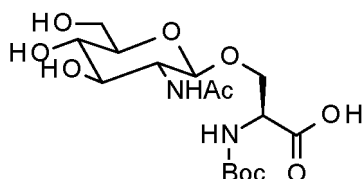


El compuesto 1-1B (2,77 g, 4,44 mmol) se disolvió en diclorometano (50 ml). A la solución, se añadieron (2S)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-hidroxiopropanoato de bencilo (1,31 g, 4,44 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (8,0 μ l, 0,0444 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadió a ello trietilamina (0,1 ml), y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 75:25 - 33:67, v/v) para obtener un producto en bruto del compuesto intermedio en forma de un sólido de color blanco (2,01 g).

El producto en bruto obtenido (2,01 g) del compuesto intermedio se disolvió en anhídrido acético (50 ml). A la solución, se añadió a temperatura ambiente cinc (1,5 g, 22,9 mmol), se lavó con ácido clorhídrico 0,1 N, metanol, y se añadió dietil éter en este orden, y la mezcla se agitó durante 6 horas. La solución de reacción se filtró a través de Celite, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó dos veces por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 50:50 - 0:100, v/v) para obtener el compuesto del título 1-1C en forma de un sólido incoloro (0,846 g, rendimiento en 2 etapas: 31%). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7,40-7,33 (5H, m), 5,52-5,43 (2H, m), 5,29-5,15 (3H, m), 5,04 (1H, t, J = 9,6 Hz), 4,70 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,49-4,46 (1H, m), 4,27-4,23 (2H, m), 4,11-4,07 (1H, m), 3,84 (1H, dd, J = 10,6, 3,5 Hz), 3,75-3,73 (1H, m), 3,64-3,62 (1H, m), 2,07 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,02 (3H, s), 1,94 (3H, s), 1,46 (9H, s).

(1-1D) Síntesis de ácido (2S)-3-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoico (compuesto 1-1D: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 42]



Al compuesto 1-1C (846 mg, 1,35 mmol), se añadieron paladio al 10 %-carbono (producto humedecido en agua aproximadamente al 50 %) (150 mg), acetato de etilo (5 ml), y etanol (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas en atmósfera de hidrógeno. La solución de reacción se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto del compuesto intermedio en forma de un aceite incoloro (740 mg).

El producto en bruto obtenido (740 mg) del compuesto intermedio se disolvió en metanol (10 ml). A la solución, se añadió una solución 0,5 M de metóxido sódico en metanol (14 ml, 7,0 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió Dowex-50 a la solución de reacción hasta que la solución de reacción se volvió débilmente ácida. Después, la mezcla se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener el compuesto del título 1-1D en forma de un sólido de color pardo claro (543 mg, rendimiento en 2 etapas: 98%).

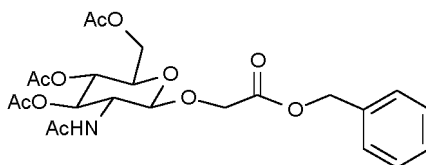
RMN ^1H (CD_3OD) δ : 4,44 (1H, d, J = 8,8 Hz), 4,28-4,25 (1H, m), 4,16 (1H, dd, J = 10,4, 4,4 Hz), 3,87 (1H, dd, J = 12,0, 2,0 Hz), 3,80 (1H, dd, J = 10,4, 4,4 Hz), 3,68 (1H, dd, J = 12,0, 5,6 Hz), 3,62-3,58 (1H, m), 3,45 (1H, dd, J = 10,5, 8,5 Hz), 3,29-3,24 (2H, m), 2,00 (3H, s), 1,44 (9H, s).

FAB-MS: Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{10}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 409, Encontrado 409.

<Ejemplo 1-2>

(1-2A) Síntesis de 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetato de bencilo (compuesto 1-2A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 43]

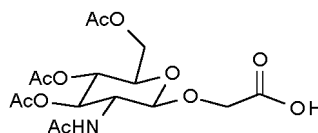


Se disolvió 4',5'-Dihidro-2'-metiloxazolo[5',4':1,2]-3,4,6-triO-acetil-1,2-didesoxi- α -glucopiranososa (4,30 g, 13,1 mmol) producida de acuerdo con la descripción de Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485-500 en dicloroetano (50 ml). A la solución, se añadieron glicolato de bencilo (5,56 ml, 39,1 mmol) y p-toluenosulfonato de piridinio (1,64 g, 6,53 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas. La solución de reacción se enfrió y después se añadió a una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico con refrigeración en hielo, y la materia orgánica se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico, una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, y solución salina saturada, después se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 60:40 -

0:100, v/v) para obtener el compuesto del título 1-2A en forma de un sólido incoloro (3,45 g, rendimiento: 53%).
RMN ^1H (CDCl_3) δ : 7,37-7,34 (5H, m), 5,85 (1H, d, J = 8,8 Hz), 5,16-5,08 (4H, m), 4,66 (1H, d, J = 8,3 Hz), 4,33 (2H, s), 4,22 (1H, dd, J = 12,2, 4,4 Hz), 4,09 (1H, dd, J = 12,2, 2,4 Hz), 4,07-4,02 (1H, m), 3,64-3,62 (1H, m), 2,05 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,91 (3H, s).

(1-2B) Síntesis de ácido 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacético (compuesto 1-2B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 44]

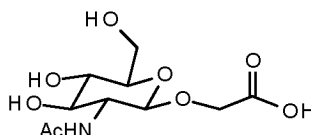


El compuesto 1-2A (3,45 g, 6,96 mmol) se disolvió en metanol (54 ml). A la solución, se añadió hidróxido de paladio al 20 %-carbono (690 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,0 horas en atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El sólido obtenido mediante la adición de diisopropil éter se recogió por filtración para obtener el compuesto del título 1-2B en forma de un sólido incoloro (2,72 g, rendimiento: 96%).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 6,36 (1H, d, J = 8,8 Hz), 5,21-5,10 (2H, m), 4,70 (1H, d, J = 8,8 Hz), 4,39 (1H, d, J = 16,9 Hz), 4,32 (1H, d, J = 16,9 Hz), 4,28 (1H, dd, J = 12,2, 4,9 Hz), 4,15 (1H, dd, J = 12,2, 2,4 Hz), 4,11-4,05 (1H, m), 3,72-3,70 (1H, m), 2,10 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,04 (3H, s), 1,97 (3H, s).

(1-2C) Síntesis de ácido 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacético (compuesto 1-2C: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 45]



El compuesto 1-2B (2,72 g, 6,73 mmol) se disolvió en metanol (42 ml). A la solución, se añadió una solución de 5 mol/l de metóxido sódico en metanol (2 ml, 10 mmol) a temperatura ambiente, y después la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello agua destilada (4 ml), y después se añadió una resina de intercambio iónico (Dowex 50wx8) a la mezcla para ajustar su pH a 3. La solución de reacción se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El sólido obtenido mediante la adición de diisopropil éter se recogió por filtración para obtener el compuesto del título 1-2C en forma de un sólido incoloro (2,72 g, rendimiento: 96%).

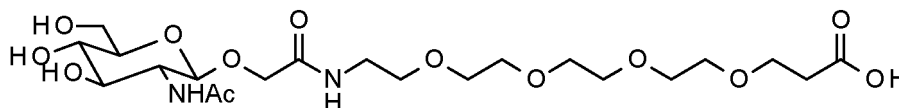
RMN ¹H (D₂O, TMS) δ: 4,57 (1H, d, J = 8,6 Hz), 4,17 (2H, s), 3,91 (1H, dd, J = 12,5, 1,6 Hz), 3,77-3,72 (2H, m), 3,56-3,41 (3H, m), 2,05 (3H, s).

ESI-LC-MS: Calc. para C₁₀H₁₇NO₈: [M+H]⁺ 280, Encontrado 280.

<Ejemplo 1-3>

- 5 (1-3A) Síntesis de ácido 3-[2[2[2[2[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-3A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 46]

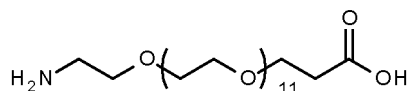


- Se pusieron 1,20 mmol/g de una resina de cloruro de 2-clorotritilo (694 mg, 0,833 mmol) en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió a ello diclorometano (5 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos. Después de la filtración, se añadió a ello una solución de ácido 3-[2[2[2[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (488 mg, 1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (730 µl, 4,17 mmol) en diclorometano (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano (diclorometano: metanol:N,N-diisopropiletilamina = 85:10:5, v/v) tres veces, diclorometano tres veces, y N,N-dimetilformamida tres veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (5 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida tres veces, diclorometano tres veces, y dietil éter tres veces y se secó en una bomba de vacío. Se puso una alícuota (200 mg) de la resina obtenida (800 mg) en una columna para síntesis en fase sólida, y se añadieron a ello N,N-dimetilformamida (2,5 ml), trietilamina (406 µl, 2,92 mmol) y agua (0,5 ml). Se añadió a ello una solución obtenida por agitación del compuesto 1-2C (174 mg, 0,625 mmol), N,N-dimetilformamida (3 ml), trietilamina (174 µl, 1,25 mmol), y cloruro de dimetilfosfonoilo (80 mg, 0,625 mmol) a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se filtro, y la resina se lavó con N,N-dimetilformamida tres veces y diclorometano tres veces. Se añadió a ello una solución al 1 % de ácido trifluoroacético en diclorometano (2 ml), y la mezcla se agitó durante 2 minutos, seguido de la recuperación del filtrado. Esta operación se realizó 10 veces. El disolvente en la solución recuperada se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. El producto en bruto se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-3A en forma de un sólido de color blanco (25 mg). ESI-LC-MS: Calc. para C₂₁H₃₈N₂O₁₃: [M+H]⁺ 526, Encontrado 526.

<Ejemplo 1-4>

- 30 (1-4A) Síntesis de ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-4A: compuesto de la siguiente fórmula)

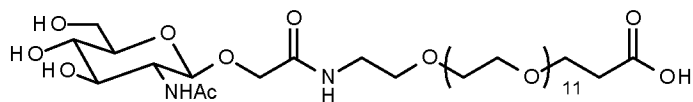
[Fórmula 47]



- Se disolvió ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (320 mg, 0,38 mmol) en metanol (2 ml) y agua destilada (2 ml). A la solución, se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sodico (1 ml) a 0 °C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió a ello ácido clorhídrico 1 N (1 ml) a 0 °C, y el disolvente orgánico se retiró por destilación a presión reducida. Al residuo, se añadió agua destilada (10 ml), y el producto resultante se lavó con diclorometano, después se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes, y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-4A en forma de un aceite incoloro (233,5 mg, 99 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,63 (2H, s a), 3,79 (2H, t, J = 5,1 Hz), 3,75 (2H, t, J = 5,9 Hz), 3,70-3,68 (2H, m), 3,65-3,61 (42H, m), 3,21-3,17 (2H, m), 2,58 (2H, t, J = 5,9 Hz).

(1-4B) Síntesis de ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-4B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 48]



5 El compuesto 1-2C (36,6 mg, 0,13 mmol) se disolvió en dimetilformamida (500 μ l). A la solución, se añadió trietilamina (45,7 μ l, 0,33 mmol) a temperatura ambiente, después se añadió una solución de cloruro de dimetilfosfínico (16,9 mg, 0,13 mmol) en dimetilformamida (500 μ l) a 0 $^{\circ}$ C, y la mezcla se agitó a 0 $^{\circ}$ C durante 0,5 horas.

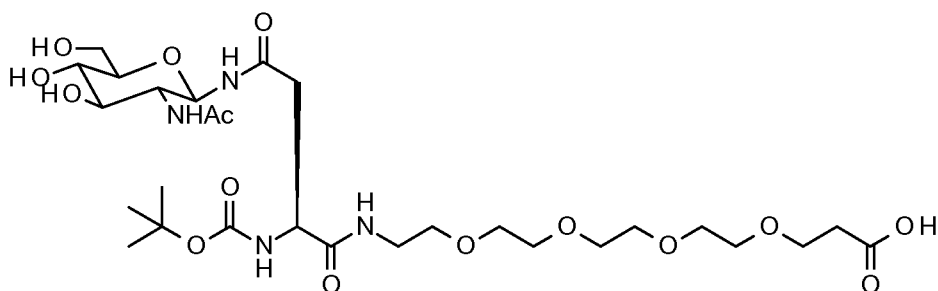
10 El compuesto 1-4A (67,5 mg, 0,11 mmol) se disolvió en dimetilformamida (500 μ l). A la solución, se añadió éster activo preparado a 0 $^{\circ}$ C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se añadieron a ello agua destilada (3 ml) y ácido acético (100 μ l), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-4B en forma de un aceite incoloro (31,0 mg, 32 %).

15 RMN 1 H (CDCl₃) δ : 7,62 (1H, d, J = 6,8 Hz), 7,40 (1H, t, J = 5,4 Hz), 4,47 (1H, d, J = 8,3 Hz), 4,27 (1H, d, J = 16,1 Hz), 4,22 (1H, d, J = 16,1 Hz), 3,90 (1H, dd, J = 12,0, 3,2 Hz), 3,81 (1H, dd, J = 12,2, 4,9 Hz), 3,77 (2H, t, J = 6,1 Hz), 3,74-3,52 (54H, m), 3,39-3,34 (2H, m), 2,59 (2H, t, J = 6,1 Hz), 2,08 (3H, s).
MALDI-TOF-MS: Calc. para C₃₇H₇₀N₂O₂₁: [M+Na]⁺ 901, Encontrado 901.

<Ejemplo 1-5>

20 (1-5A) Síntesis de ácido 3-[2-[2-[2-[2-[(2S)-4-[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-5A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 49]

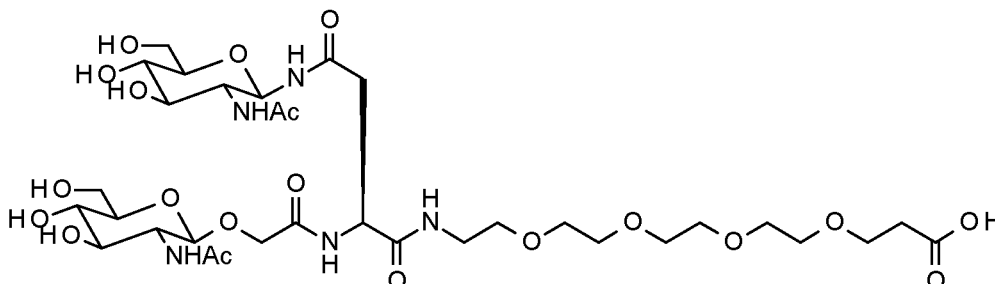


25 Se disolvió ácido 3-[2-[2-[2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (200 mg, 0,547 mmol) en una solución 4 N de ácido clorhídrico en dioxano (2 ml), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo se secó en una bomba de vacío para obtener un producto en bruto del compuesto intermedio en forma de un aceite de color pardo claro (165 mg).

30 Se disolvieron ácido (2S)-4-[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (158 mg, 0,364 mmol) producido de acuerdo con el enfoque de J. Am. Chem. Soc., 1999, 121,284-290 y HATU (138 mg, 0,364 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml). A la solución, se añadió N,N-diisopropiletilamina (128 μ l, 0,728 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Esta solución se añadió al producto en bruto obtenido (54,9 mg) del compuesto intermedio, se añadió además N,N-diisopropiletilamina (128 μ l, 0,728 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 %
35 de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-5A en forma de un sólido de color blanco (53 mg, rendimiento en 2 etapas: 43%). ESI-LC-MS: Calc. para C₂₈H₅₀N₄O₁₅: [M+H]⁺ 683, Encontrado 683.

(1-5B) Síntesis de ácido 3-[2-[2-[2-[[[(2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-[[2-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetil]amino]-4-oxobutanoil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-5B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 50]



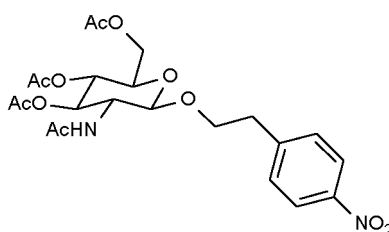
5 Al compuesto 1-5A (53 mg, 0,0777 mmol), se añadió una solución acuosa al 30 % de ácido trifluoroacético, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. La solución de reacción se diluyó con agua y se liofilizó para obtener un producto en bruto del compuesto intermedio en forma de un aceite de color pardo claro (45 mg).

El compuesto 1-2C (65,1 mg, 0,233 mmol) y trietilamina (65 µl, 0,466 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (0,5 ml). A la solución, se añadió una solución de cloruro de dimetilfosfonoilo (30 mg, 0,233 mmol) en N,N-dimetilformamida (0,5 ml) a 0 °C. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Esta solución se enfrió a 0 °C, y se añadió a ello una solución mixta del producto en bruto obtenido (45 mg) del compuesto intermedio, trietilamina (152 µl, 1,088 mmol), N,N-dimetilformamida (2,5 ml), y agua (0,5 ml). La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 8 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-5B en forma de un sólido de color blanco (9,25 mg, rendimiento en 2 etapas: 14%). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₃₃H₅₇N₅O₂₀: [M+H]⁺ 844, Encontrado 844.

<Ejemplo 1-6>

20 (1-6A) Síntesis de acetato de [(2R,3S,4R,5R,6R)-5-acetamido-3,4-diacetoxi-6-[2-(4-nitrofenil)etoxi]tetrahidropiran-2-il]metilo (compuesto 1-6A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 51]

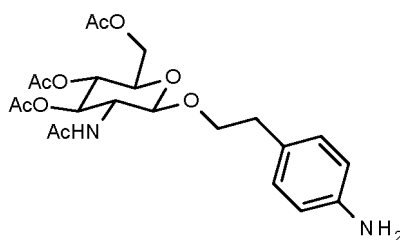


Se disolvió 4,5-dihidro-2-metiloxazolo[5',4':1,2]-3,4,6-tri-O-acetil-1,2-didesoxi-α-glucopiranososa (1,00 g, 3,04 mmol) producida de acuerdo con la descripción de Bull. Chem. Soc. Jpn., 2003, 76, 485-500 en dicloroetano (10 ml). A la solución, se añadieron tamices moleculares de 4A (312 mg), 2-(4-nitrofenil)-etanol (2,54 g, 15,2 mmol) y ácido (+)-alcanforsulfónico (0,78 g, 3,34 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 60 °C durante 3 horas. La solución de reacción se añadió a una solución saturada acuosa de bicarbonato sódico, y la materia orgánica se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina saturada, después se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 67:33 - 0:100, v/v) para obtener el compuesto del título 1-6A en forma de un sólido incoloro (1,51 g, rendimiento: 65 %).

25 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 8,14 (2H, d, J = 8,9 Hz), 7,38 (2H, d, J = 9,0 Hz), 5,32 (1H, d, J = 8,6 Hz), 5,21 (1H, dd, J = 10,6, 9,4 Hz), 5,07 (1H, t, J = 9,6 Hz), 4,63 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,25 (1H, dd, J = 12,1, 4,7 Hz), 4,20-4,12 (2H, m), 3,88 (1H, dt, J = 10,6, 8,6 Hz), 3,72-3,64 (2H, m), 3,06-2,93 (2H, m), 2,09 (3H, s), 2,03 (3H, s), 2,03 (3H, s), 1,84 (3H, s).

(1-6B) Síntesis de acetato de [(2R,3S,4R,5R,6R)-5-acetamido-3,4-diacetoxi-6-[2-(4-aminofenil)etoxi]tetrahidropiran-2-il]metilo (compuesto 1-6B: compuesto de la siguiente fórmula)

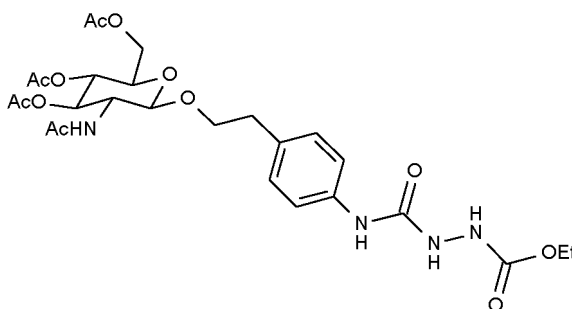
[Fórmula 52]



El compuesto 1-6A (982,0 mg, 1,98 mmol) se disolvió en acetato de etilo (12 ml) y etanol (12 ml). A la solución, se añadió paladio al 10 %-carbono (250 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas en atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener el compuesto del título 1-6B en forma de un sólido incoloro (758 mg, rendimiento: 82 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ: 6,99 (2H, d, J = 8,6 Hz), 6,61 (2H, d, J = 8,6 Hz), 5,32 (1H, d, J = 9,0 Hz), 5,24 (1H, dd, J = 10,6, 9,4 Hz), 5,06 (1H, t, J = 9,6 Hz), 4,60 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,26 (1H, dd, J = 12,1, 4,7 Hz), 4,15-4,04 (3H, m), 3,84 (1H, dt, J = 10,6, 8,4 Hz), 3,68-3,58 (4H, m), 2,78-2,77 (2H, m), 2,09 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,02 (3H, s), 1,88 (3H, s).

(1-6C) Síntesis de acetato de [(2R,3S,4R,5R,6R)-5-acetamido-3,4-diacetoxi-6-[2-[4-[(etoxicarbonilamino)carbamoilamino]fenil]etoxi]tetrahidropiran-2-il]metilo (compuesto 1-6C: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 53]

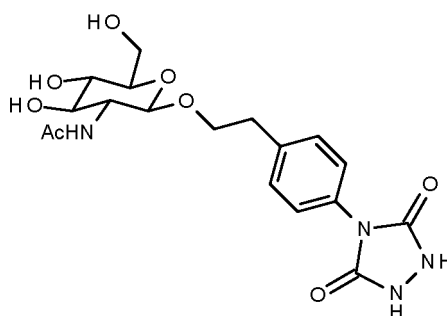


El compuesto 1-6B (568,0 mg, 1,22 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (22 ml). A la solución, se añadió trietilamina (424 μl, 3,04 mmol) a temperatura ambiente, después se añadió clorofornato de 4-nitrofenilo (441,8 mg, 2,19 mmol) a -10 °C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió trietilamina (424 μl, 3,04 mmol) a ello a temperatura ambiente, después se añadió carbazato de etilo (228,2 mg, 2,19 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de reacción se añadió a agua, y la materia orgánica se extrajo con acetato de etilo dos veces. La fase orgánica se lavó con una solución salina saturada, después se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (diclorometano:metanol = 100:0 - 90:10, v/v) para obtener el compuesto del título 1-6C en forma de una espuma incolora (650,4 mg, rendimiento: 90%).

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,88 (1H, s a), 7,24 (2H, s), 7,02 (2H, d, J = 8,2 Hz), 6,58 (1H, s a), 5,27 (1H, t, J = 10,0 Hz), 5,04 (1H, t, J = 10,0 Hz), 4,64 (1H, d, J = 8,6 Hz), 4,27-4,05 (5H, m), 3,90-3,81 (1H, m), 3,73-3,68 (1H, m), 3,61-3,55 (1H, m), 3,49 (2H, d, J = 4,3 Hz), 2,85-2,70 (2H, m), 2,07 (3H, s), 2,00 (6H, s), 1,82 (3H, s), 1,27 (3H, t, J = 9,4 Hz).

(1-6D) Síntesis de N-[(2R,3S,4R,5R,6R)-3-acetamido-2-[2-[4-(3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-il)fenil]etoxi]-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]acetamida (compuesto 1-6D: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 54]



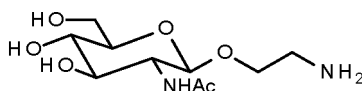
El compuesto 1-6C (650,0 mg, 1,09 mmol) se disolvió en metanol (30 ml). A la solución, se añadió carbonato potásico (451,8 mg, 3,27 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 60 °C durante 9,5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-6D en forma de un sólido incoloro (462,4 mg, 85 %).

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 7,35 (4H, dd, J = 13,1, 8,8 Hz), 4,36 (1H, d, J = 8,2 Hz), 4,17 (1H, dt, J = 11,0, 4,8 Hz), 3,87 (1H, dd, J = 11,9, 2,2 Hz), 3,70-3,62 (3H, m), 3,39 (1H, dd, J = 10,2, 8,6 Hz), 3,28-3,22 (2H, m), 2,90 (2H, t, J = 6,3 Hz). ESI-TOF-MS: Calc. para C₁₈H₂₄N₄O₈: [M+H]⁺ 425, Encontrado 425.

10 <Ejemplo 1-7>

(1-7A) Síntesis de 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilamina (compuesto 1-7A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 55]

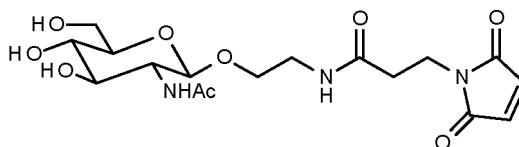


Se disolvió N-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilazida (500 mg, 1,72 mmol) en etanol (20 ml). A la solución, se añadió paladio al 10 %-carbono (200 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas en atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener el compuesto del título 1-7A en forma de un sólido incoloro (460 mg, rendimiento: cuant.).

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 4,38 (1H, d, J = 8,3 Hz), 3,90-3,82 (2H, m), 3,69-3,55 (2H, m), 3,46-3,40 (1H, m), 2,80-2,73 (2H, m), 1,98 (3H, s).

20 (1-7B) Síntesis de N-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietil]-3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanamida (compuesto 1-7B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 56]



El compuesto 1-7A (100 mg, 0,378 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida. A la solución, se añadió 3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (0,126 mg, 0,473 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-7B en forma de un sólido de color blanco (93 mg, rendimiento: 59%).

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 6,82 (2H, s), 4,38 (1H, d, J = 8,6 Hz), 3,89-3,87 (1H, m), 3,78-3,75 (3H, m), 3,66-3,62 (3H, m), 3,44-3,38 (1H, m), 2,67 (4H, s), 2,46 (2H, t, J = 7,0 Hz), 1,98 (3H, s).

y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración de la solución de reacción. Esta operación se realizó 4 veces. Después de lavar con N,N-dimetilformamida 4 veces, se añadió a ello una solución de ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético (669 mg, 2,25 mmol), HATU (856 mg, 2,25 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (582 µl, 4,50 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

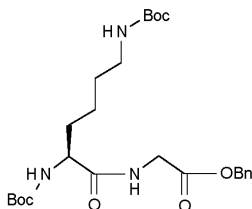
5 Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (20 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración de la solución de reacción. Esta operación se realizó 4 veces. Después de lavar con N,N-dimetilformamida 4 veces, se añadió a ello una solución de ácido (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-3-tritilsulfanil]propanoico (1,32 g, 2,25 mmol), HATU (856 mg, 2,25 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (582 µl, 4,50 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (20 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración de la solución de reacción. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces y se lavó con diclorometano 4 veces y dietil éter 4 veces. La resina se secó en una bomba de vacío y se recuperó (1,83 g). Se puso una alícuota (360 mg) de la resina recuperada en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió a ello una solución de ácido acético (27 mg, 0,45 mmol), HATU (171 mg, 0,45 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (154 µl, 0,90 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces y diclorometano 4 veces. Se añadió a ello una solución mixta de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (1 ml) y diclorometano (3 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La resina se retiró por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida. El concentrado se sometió a azeotropía con diclorometano tres veces y se secó en una bomba de vacío para obtener el compuesto del título 1-8A en forma de un sólido de color pardo (176 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{122}H_{114}N_{10}O_{12}S_5$: $[M+Na]^+$ 2094, Encontrado 2094.

<Ejemplo 1-9>

25 (1-9A) Síntesis de 2-[[[(2S)-2,6-bis(terc-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]acetato de bencilo (compuesto 1-9A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 58]



A una solución de ácido (2S)-2,6-bis(terc-butoxicarbonilamino)hexanoico (1,70 g, 5,00 mmol), 2-aminoacetato de bencilo (1,00 g, 5,00 mmol) y HATU (2,90 g, 7,50 mmol) en N,N-dimetilformamida (25 ml), se añadió N,N-diisopropiletilamina (2,60 ml, 15,0 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La solución de reacción se añadió a agua, y la materia orgánica se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina saturada, después se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 90:10 - 0:100, v/v) para obtener el compuesto del título 1-9A en forma de un aceite de color amarillo pálido (2,30 g, rendimiento: 93%).

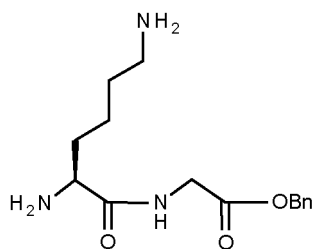
35 RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 7,40-7,33 (5H, m), 6,63 (1H, s), 5,18 (2H, s), 5,11 (1H, s), 4,63 (1H, s), 4,15-4,03 (3H, m), 3,16-3,06 (2H, m), 1,91-1,81 (1H, m), 1,70-1,59 (1H, m), 1,53-1,24 (22H, m).
MS (ESI): Calc. para $C_{25}H_{40}N_3O_7$: $[M+H]^+$ 494, Encontrado 494.

(1-9B) Síntesis de 2-[[[(2S)-2,6-bis(terc-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]acetato de bencilo (compuesto 1-9B: compuesto de la siguiente fórmula)

40

45

[Fórmula 59]

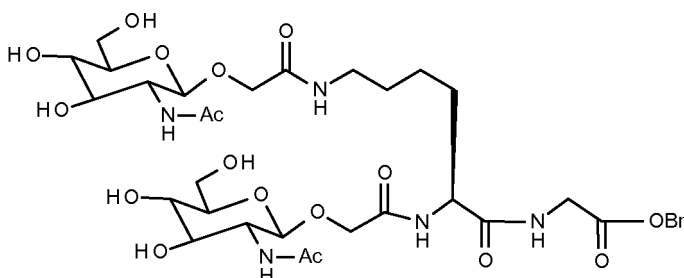


El compuesto 1-9A (250 mg, 0,507 mmol) se disolvió en diclorometano (3,0 ml). A la solución, se añadió trifluoroacético ácido (1,0 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener el compuesto del título 1-9B en forma de un aceite de color amarillo pálido (247 mg, rendimiento: 100%).

- 5 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,95 (1H, t, J = 5,9 Hz), 8,18 (2H, s), 7,71 (2H, s), 7,42-7,34 (5H, m), 5,16 (2H, d, J = 12,5 Hz), 4,12-3,96 (2H, m), 3,87-3,78 (1H, m), 2,78-2,66 (2H, m), 1,76-1,66 (2H, m), 1,54-1,47 (2H, m), 1,40-1,31 (2H, m).

(1-9C) Síntesis de 2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetil]amino]hexanoil]amino]acetato de bencilo (compuesto 1-9C: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 60]

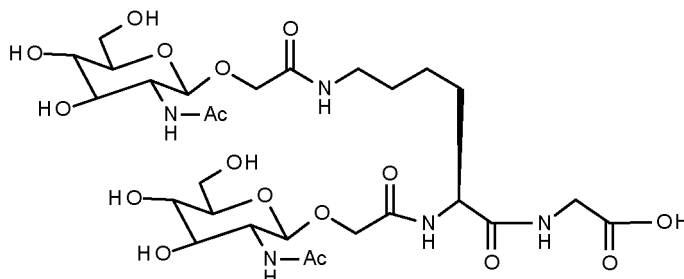


- 10 El compuesto del título 1-9C se obtuvo en forma de una espuma incolora (180 mg, rendimiento: 88 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-5B) usando los compuestos 1-9B (93,0 mg, 0,190 mmol) y 1-2C (160 mg, 0,573 mmol).

- 15 RMN ¹H (CD₃OD) δ: 7,39-7,29 (5H, m), 5,16 (2H, s), 4,94-4,84 (2H, m), 4,46-4,39 (3H, m), 4,33-4,27 (2H, m), 4,13-4,00 (3H, m), 3,94 (1H, d, J = 17,6 Hz), 3,91-3,84 (2H, m), 3,78-3,66 (4H, m), 3,50-3,42 (2H, m), 3,38-3,28 (2H, m), 3,22 (2H, t, J = 6,6 Hz), 2,03 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,88-1,81 (1H, m), 1,78-1,67 (1H, m), 1,58-1,50 (2H, m), 1,48-1,35 (2H, m).

(1-9D) Síntesis de ácido 2-[[[(2S)-2,6-bis[[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacetil]amino]hexanoil]amino]acético (compuesto 1-9D: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 61]



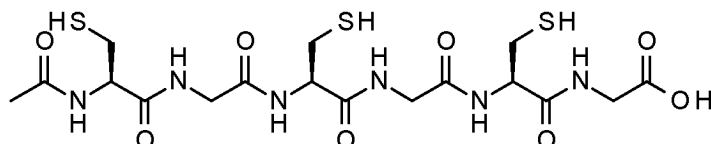
- 20 El compuesto 1-9C (180 mg, 0,221 mmol) se disolvió en metanol (50 ml). A la solución, se añadió paladio al 10 %-carbono (180 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas en atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para

obtener el compuesto del título 1-9D en forma de una espuma de color amarillo pálido (160 mg, rendimiento: 100%).
MS (ESI): Calc. para $C_{28}H_{48}N_5O_{17}$: $[M+H]^+$ 726, Encontrado 726.

<Ejemplo 1-10>

5 (1-10A) Síntesis de ácido 2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-acetamido-3-sulfanilpropanoil]amino]acetil]amino]-3-sulfanilpropanoil]amino]acetil]amino]-3-sulfanilpropanoil]amino]acético (compuesto 1-10A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 62]

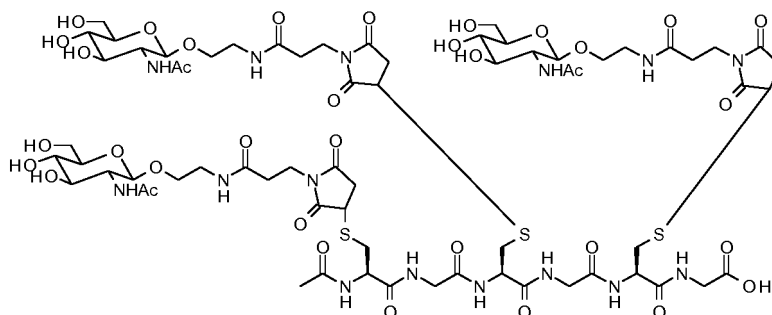


Una resina de 1,20 mmol/g de cloruro de 2-clorotritilo (208 mg, 0,25 mmol) se puso en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió diclorometano (2,5 ml) a ello, y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Después de la filtración, se añadió a ello una solución de ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético (149 mg, 0,5 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (219 μ l, 1,25 mmol) en diclorometano (2,5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano (diclorometano:metanol:N,N-diisopropiletilamina = 85:10:5, v/v) tres veces, diclorometano tres veces, y N,N-dimetilformamida tres veces. La resina obtenida se cargó en un sintetizador de péptidos (Sintetizador de Péptidos 433A fabricado por Applied Biosystems, Inc.) y se sometió a desprotección, condensación, desprotección, condensación, desprotección, condensación, desprotección, condensación, desprotección, condensación, desprotección, y condensación en el sintetizador para alargar la cadena peptídica. Para la desprotección, se usaron piperidina y N-metilpirrolidona. Para las reacciones de condensación, se usaron HATU, N,N-diisopropiletilamina, N-metilpirrolidona, y diversos ácidos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos se usaron en cada reacción de condensación en el orden de ácido (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-3-tritilsulfanil]propanoico, ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético, ácido (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-3-tritilsulfanil]propanoico, ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético, ácido (2R)-2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-3-tritilsulfanil]propanoico, y ácido acético. La mitad (450 mg) de la cantidad de la resina obtenida (900 mg) se puso en una columna para síntesis en fase sólida, y se añadió a ello una solución mixta de ácido trifluoroacético (2,64 ml), agua (0,27 ml), fenol (0,06 g), y triisopropilsilano (0,03 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y el ácido trifluoroacético se retiró por destilación. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-10A en forma de un sólido de color blanco (11 mg, rendimiento: 16 %).

30 ESI-LC-MS: Calc. para $C_{17}H_{28}N_6O_8S_3$: $[M+H]^+$ 541, Encontrado 541.

(1-10B) Síntesis de ácido 2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-[[2-[[[(2R)-2-acetamido-3-[1-[3-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilamino]-3-oxopropil]-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilpropanoil]amino]acetil]amino]-3-[1-[3-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-piran-2-il]oxietilamino]-3-oxopropil]-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilpropanoil]amino]acetil]amino]-3-[1-[3-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilamino]-3-oxopropil]-2,5-dioxopirrolidin-3-il]sulfanilpropanoil]amino]acético (compuesto 1-10B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 63]



Los compuestos 1-10B (11 mg, 0,0203 mmol) y 1-7B (33 mg, 0,0794 mmol) se disolvieron en una solución mixta de acetonitrilo (1 ml) y un tampón fosfato 0,2 M de pH 6,75 (1 ml), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-10B en forma de un sólido de color blanco (27 mg, rendimiento: 74%).

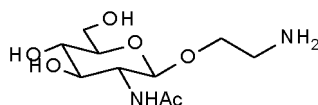
5 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{68}H_{103}N_{15}O_{35}S_3$: $[M-H]^+$ 1784, Encontrado 1784.

<Ejemplo 1-11>

(1-11 A) Síntesis de trifluoroacetato de N-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropirán-2-il]oxietilamina (compuesto 1-11A: compuesto de la siguiente fórmula)

10

[Fórmula 64]

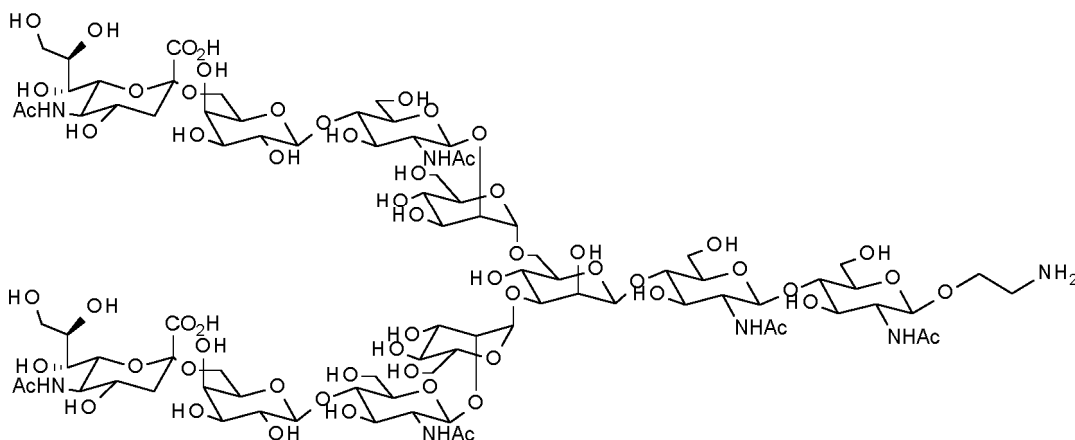


TFA

El compuesto 1-7A (120 mg) se disolvió en agua destilada (6 ml). A la solución, se añadió después ácido trifluoroacético (48 μ l), y la mezcla se liofilizó. El sólido amorfo obtenido 1-11A se usó sin purificarse.

(1-11B) Síntesis de SG-NH₂ (compuesto 1-11B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 65]



Se disolvió sialilglucopéptido (60 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (260 μ l). A la solución, se añadió después una solución acuosa (100 μ l) de glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml). El compuesto 1-11A (28 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (160 μ l) se añadió además a ello, y la mezcla se hizo reaccionar a 28 °C durante 72 horas. La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2480 μ l) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-NH₂ (28,5 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{86}H_{143}N_7O_{62}$: $[M-H]^-$ 2264,8, Encontrado 2264,8

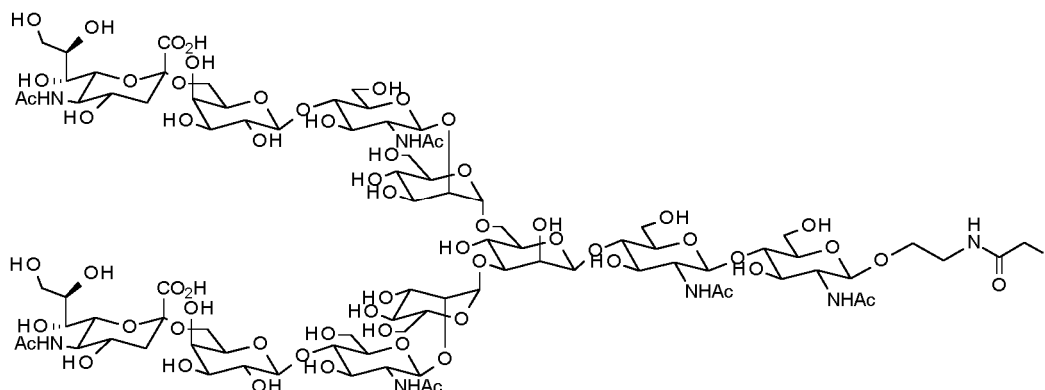
15

20

(1-11C) Síntesis de SG-I (compuesto 1-11C: compuesto de la siguiente fórmula)

25

[Fórmula 66]

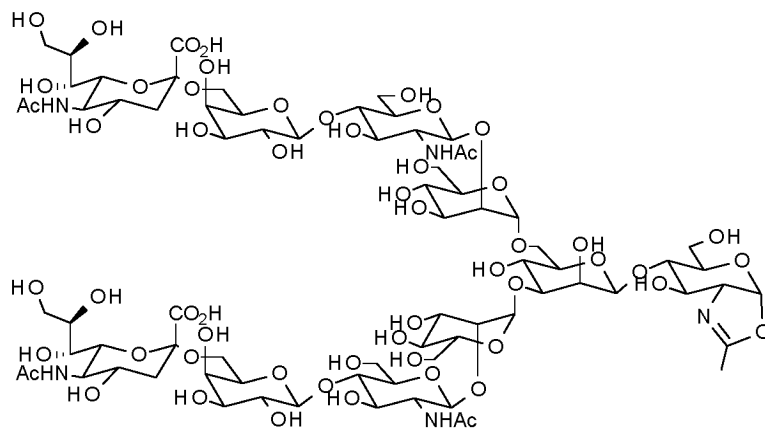


El compuesto SG-NH₂ (15,0 mg) producido en (1-11B) se disolvió en una solución acuosa 43 mM de bicarbonato sódico (750 µl). A la solución, se añadió una solución 30 mM de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido yodoacético en acetona (250 µl) con refrigeración en hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se terminó mediante la adición de ácido acético (1,8 µl) a la solución de reacción, y el disolvente orgánico se retiró a presión reducida. El producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-I (13,4 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para C₈₈H₁₄₄IN₇O₆₃: [M+2H]²⁺ 1218,5 (prom.), Encontrado 1218,3

<Ejemplo 1-12>

- 10 (1-12A) Síntesis de SG-Oxa (compuesto 1-12A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 67]



Se disolvió disialooctasacárido (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 26,0 mg, 12,8 µmol) en agua destilada (210 µl). A la solución, se añadió trietilamina (80,7 µl, 579 µmol) a temperatura ambiente. Se añadió a ello una solución acuosa (52 l) de cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolio (32,6 mg, 192 µmol) a 0 °C, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 2 horas. El producto resultante se purificó con Sephadex G15 (solución acuosa al 0,03 % de NH₃). Se añadió a ello una solución acuosa 0,1 N de hidróxido sódico (100 µl), y la mezcla se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-Oxa en forma de un sólido incoloro (24,6 mg, 95 %).

RMN (en D₂O) (recuadro de la Figura 1).

<Ejemplo 1-13>

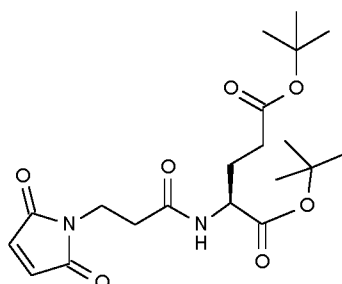
- (1-13A) Síntesis de SG-M (compuesto 1-13A: compuesto de la siguiente fórmula)

Se disolvió sialilglucopéptido (58 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (254 µl). A la solución, se añadió después una solución acuosa (100 µl) de glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml). El compuesto 1-14A (24 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (152 µl) se añadió además a ello, y la mezcla se hizo reaccionar a 28 °C durante 72 horas. La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (3000 µl) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (Shiseido Co., Ltd., Proteonavi) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-A (19,5 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para C₈₆H₁₄₀N₆O₆₄: [M+2H]²⁺ 1142,0 (prom.), Encontrado 1141,4

10 <Ejemplo 1-15>

(1-15A) Síntesis de (2S)-2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]pentanodicarboxilato de di-terc-butilo (compuesto 1-15A: compuesto de la siguiente fórmula)

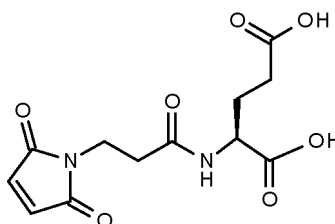
[Fórmula 71]



Una solución de clorhidrato de (2S)-2-aminopentanodicarboxilato de di-terc-butilo (295 mg, 1,00 mmol) en N,N-dimetilformamida (5,0 ml) se enfrió a 0 °C. Se añadieron a ello N,N-diisopropiletilamina (0,510 ml, 3,00 mmol) y 3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (293 mg, 1,10 mmol) en este orden, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora, se calentó adicionalmente a temperatura ambiente, y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió acetato de etilo a la solución de reacción. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico 1 M y solución salina saturada en este orden, después se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 95:5 - 0:100, v/v) para obtener el compuesto del título 1-15A en forma de un aceite de color amarillo pálido (400 mg, rendimiento: 98%).
RMN ¹H (CDCl₃) δ: 6,70 (2H, s), 6,22 (1H, d, J = 7,8 Hz), 4,48-4,42 (1H, m), 3,91-3,79 (2H, m), 2,60-2,52 (2H, m), 2,35-2,18 (2H, m), 2,13-2,04 (1H, m), 1,93-1,84 (1H, m), 1,46 (9H, s), 1,44 (9H, s).

(1-15B) Síntesis de ácido (2S)-2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]pentanodicarboxílico (compuesto 1-15B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 72]

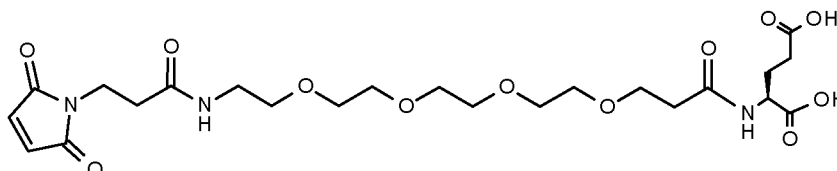


El compuesto del título 1-15B (260 mg, rendimiento: 89 %) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-9B) usando el compuesto 1-15A (400 mg, 0,976 mmol).
MS (ESI): Calc. para C₁₂H₁₅N₂O₇: [M+H]⁺ 299, Encontrado 299.

(1-15C) Síntesis de SG-(SG-Gln*)-Mal (compuesto 1-15C: compuesto de la siguiente fórmula)

(1-16B) Síntesis de ácido (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]pentanodioico (compuesto 1-16B: compuesto de la siguiente fórmula)

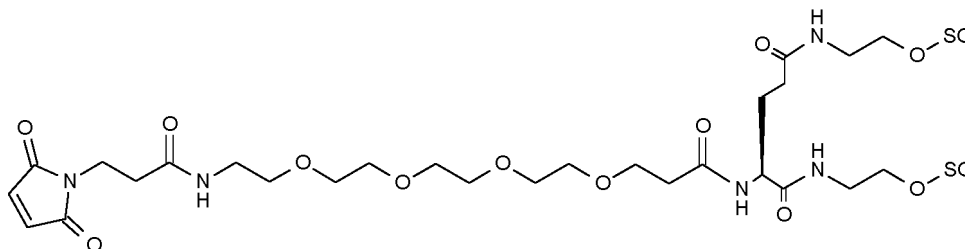
[Fórmula 75]



5 El compuesto del título 1-16B (83 mg, rendimiento: 100 %) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-9B) usando el compuesto 1-16 (100 mg, 0,152 mmol).
MS (ESI): Calc. para $C_{23}H_{36}N_3O_{12}$: $[M+H]^+$ 546, Encontrado 546.

(1-16C) Síntesis de SG-(SG-Gln*)-PEG(3)-Mal (compuesto 1-16C: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 76]



10 Una solución del compuesto 1-16B (32,0 mg, 58,7 μ mol) y N-hidroxisuccinimida (34,0 mg, 0,295 mmol) en diclorometano (0,400 ml) se enfrió a 0 °C. Se añadieron a ello piridina (0,200 ml, 2,48 mmol) y anhídrido trifluoroacético (42,0 μ l, 0,300 mmol) en este orden, y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió diclorometano a la solución de reacción. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico 1 M, después se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se filtró, y el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto (35 mg).

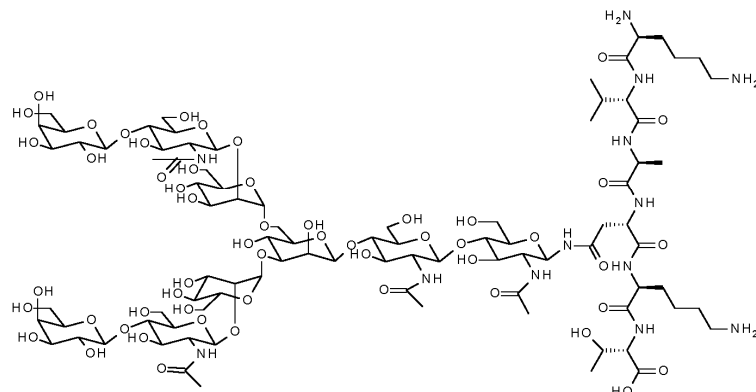
15 Posteriormente, se disolvió una alícuota (0,31 mg) del producto en bruto obtenido en N,N-dimetilformamida (20 μ l). La solución se añadió a una solución de el compuesto SG-NH₂ (2,0 mg, 0,88 μ mol) producido en (1-11B) y N,N-diisopropiletilamina (1,5 μ l, 8,8 μ mol) en N,N-dimetilformamida (30 μ l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2,0 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-(SG-Gln*)-PEG(3)-Mal (0,60 mg, rendimiento: 28%).

20 ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{195}H_{320}N_{17}O_{134}$: $[M+3H]^{3+}$ 1682,2 (prom.), Encontrado 1682,2.

<Ejemplo 1-17>

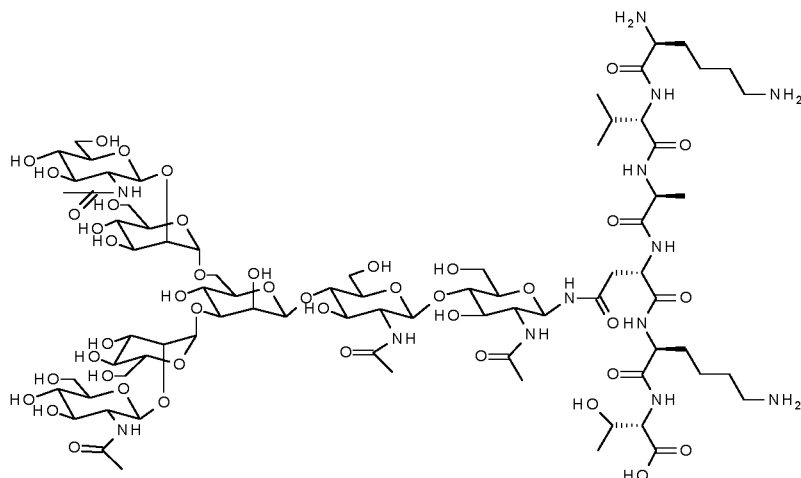
25 (1-17A) Síntesis de AG(9)-P (compuesto 1-17A: compuesto 1 de la siguiente fórmula)

[Fórmula 77]



- Se disolvió sialilglucopéptido (200 mg) en una solución de tampón acetato 0,2 M (pH 5,0) (1000 µl). A la solución, se añadió después una solución acuosa (1000 µl) de neuraminidasa ([E.C.3.2.1.18], Nacalai Tesque, Inc., 1 U/ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 17 horas. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2000 µl). Se combinaron dos lotes de esta reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG(9)-P (307 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{90}H_{155}N_{13}O_{54}$: $[M+2H]^{2+}$ 1142,6 (prom.), Encontrado 1142,0 (1-17B) Síntesis de AG(7)-P (compuesto 1-17B: compuesto de la siguiente fórmula)

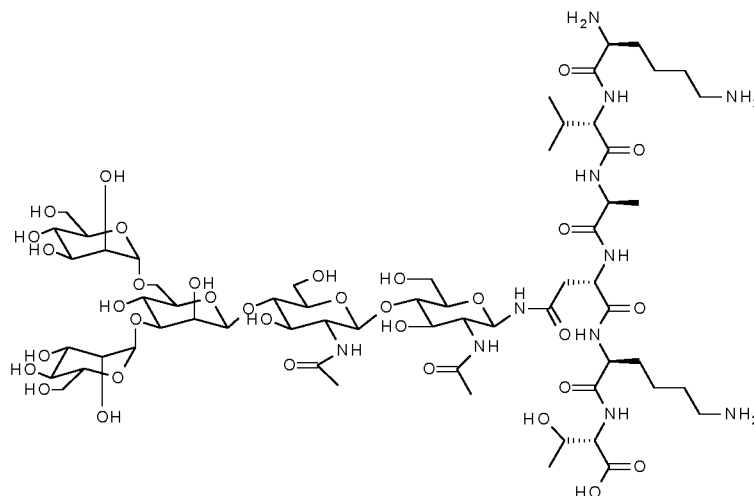
[Fórmula 78]



- El compuesto AG(9)-P (100 mg) producido en (1-17A), sulfato de magnesio (0,48 mg), y β-D-galactosidasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 600 U/mg) (2 mg) se disolvieron en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 7,0) (2000 µl), y la solución se hizo reaccionar a 37 °C durante 24 horas. Se añadió a ello β-D-galactosidasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 600 U/mg) (1 mg), y la mezcla se hizo reaccionar adicionalmente durante 24 horas. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2000 µl). Se combinaron dos lotes de esta reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG(7)-P (158 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $[M+H]^+$ $C_{78}H_{135}N_{13}O_{44}$ 1959,0 (prom.), Encontrado 1958,9 (1-17C) Síntesis de AG(5)-P (compuesto 1-17C: compuesto de la siguiente fórmula)

20

[Fórmula 79]

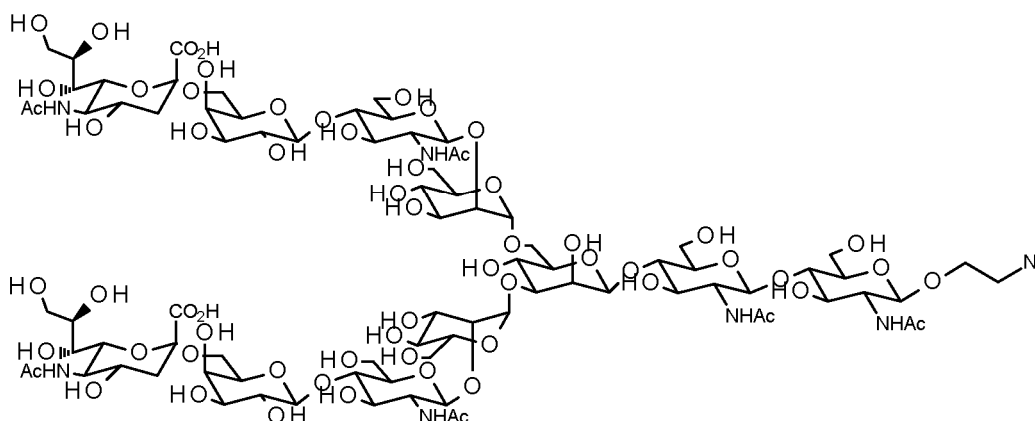


- El compuesto AG(7)-P (100 mg) producido en (1-17B) se disolvió en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (3150 μ l). A la solución, se añadieron 100 x BSA (New England BioLabs Japan Inc.) (43 μ l) y β -N-acetilglucosaminidasa (New England BioLabs Japan Inc., 4000 U/ml) (100 μ l), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 20 horas. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (1000 μ l). El producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG (5)-P (73,8 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $[M+2H]^{2+}$ $C_{62}H_{109}N_{11}O_{34}$ 777,3 (prom.), Encontrado 777,3

<Ejemplo 1-18>

- 10 (1-18A) Síntesis de SG-N₃ (compuesto 1-18A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 80]

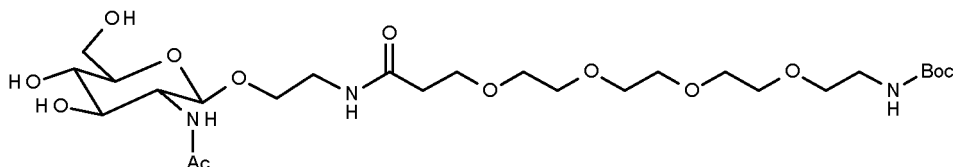


- Se disolvió sialilglucopéptido (76 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (330 μ l). A la solución, se añadió después una solución acuosa (100 μ l) de glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml). Se añadió además a ello N-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilazida (23 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (230 μ l), y la mezcla se hizo reaccionar a 28 °C durante 96 horas. La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (3000 μ l) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (Shiseido Co., Ltd., Proteonavi) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener un sólido compuesto principalmente por el compuesto del título. Posteriormente, el sólido obtenido se disolvió en agua destilada (3000 μ l), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-N₃ (34,4 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{86}H_{141}N_9O_{62}$: $[M+2H]^{2+}$ 1147,5, Encontrado 1147,4

<Ejemplo 1-19>

(1-19A) Síntesis de N-[2-[2-[2-[2-[3-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietilamino]-3-oxo-propoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etil]carbamato de terc-butilo (compuesto 1-19A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 81]

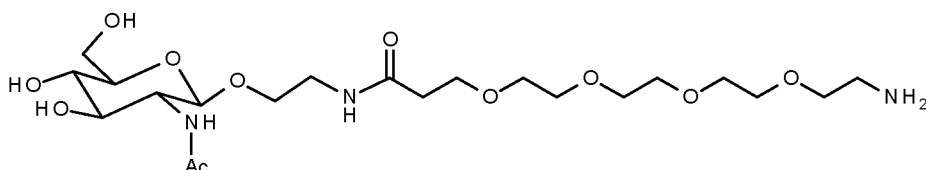


- 5 El compuesto del título 1-19A se obtuvo en forma de una espuma de color amarillo pálido (150 mg, rendimiento: 90 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-9A) usando ácido 3-[2-[2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (100 mg, 0,274 mmol) y el compuesto 1-7A (110 mg, 0,291 mmol).

MS (ESI): Calc. para $C_{26}H_{49}N_3O_{13}$: $[M+H]^+$ 612, Encontrado 612.

- 10 (1-19B) Síntesis de N-[2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxietil]-3-[2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]propanamida (compuesto 1-19B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 82]



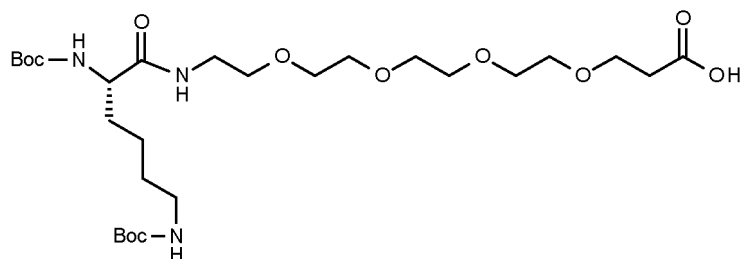
El compuesto 1-19A (150 mg, 0,245 mmol) se disolvió en diclorometano (2,0 ml). A la solución, se añadió ácido trifluoroacético (2,0 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo obtenido se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-19B (70 mg, 55 %) en forma de un aceite incoloro.

- 15 MS (ESI): Calc. para $C_{21}H_{41}N_3O_{11}$: $[M+H]^+$ 512, Encontrado 512.

<Ejemplo 1-20>

- 20 (1-20A) Síntesis de ácido 3-[2-[2-[2-[(2S)-2,6-bis(terc-butoxicarbonilamino)hexanoil]amino]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (compuesto 1-20A: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 83]



- 25 A una solución de ácido (2S)-2,6-bis(terc-butoxicarbonilamino)hexanoico (210 mg, 607 μ mol) y HATU (220 mg, 579 μ mol) en N,N-dimetilformamida (2,0 ml), se añadió N,N-diisopropiletilamina (0,410 ml, 2,41 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 minutos. La solución de reacción obtenida se añadió a una solución de ácido 3-[2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (150 mg, 497 μ mol) producido de acuerdo con el enfoque de (1-5A) y N,N-diisopropiletilamina (0,260 ml, 1,53 mmol) en N,N-dimetilformamida (0,50 ml) y la mezcla se agitó a

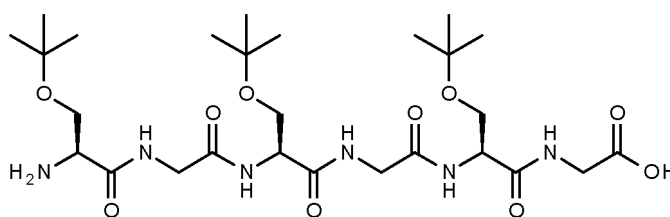
temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo obtenido se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-20A (240 mg, 80 %) en forma de un aceite de color amarillo pálido.

MS (ESI): Calc. para $C_{27}H_{52}N_3O_{11}$: $[M+H]^+$ 594, Encontrado 594.

<Ejemplo 1-21>

(1-21A) Síntesis de ácido 2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-amino-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acetil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acetil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acetil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acético (compuesto 1-21A: compuesto de la siguiente fórmula)

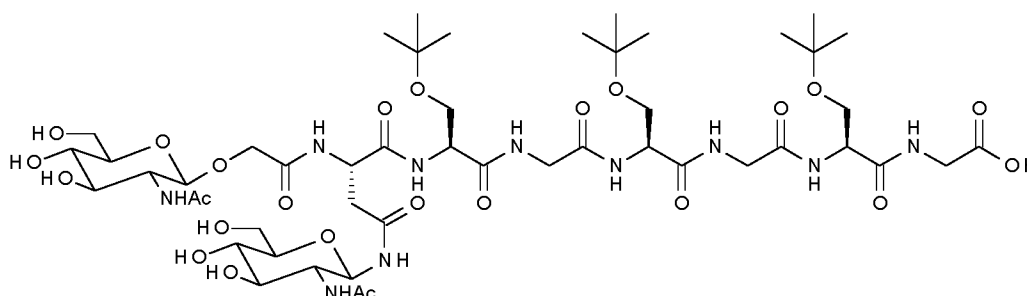
[Fórmula 84]



Una resina de 1,20 mmol/g de cloruro de 2-clorotritilo (166 mg, 0,200 mmol) se puso en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió diclorometano (3 ml) a ello, y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Después de la filtración, se añadió a ello una solución de ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético (119 mg, 0,400 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (171 μ l, 1,00 mmol) en diclorometano (3 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano (diclorometano: metanol:N,N-diisopropiletilamina = 85:10:5, v/v) tres veces, diclorometano tres veces, y N,N-dimetilformamida tres veces. La resina obtenida se cargó en un sintetizador de péptidos (Sintetizador de Péptidos 433A fabricado por Applied Biosystems, Inc.) y se sometió a desprotección, condensación, desprotección, condensación, desprotección, condensación, y desprotección en el sintetizador para alargar la cadena de péptido. Para la desprotección, se usaron piperidina y N-metilpirrolidona. Para las reacciones de condensación, se usaron HATU, N,N-diisopropil-etilamina, N-metilpirrolidona, y diversos ácidos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos se usaron en cada reacción de condensación en el orden de ácido (2S)-3-terc-butoxi-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoico, ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético, ácido (2S)-3-terc-butoxi-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoico, ácido 2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)acético, y ácido (2S)-3-terc-butoxi-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoico. La resina obtenida se puso en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió a ello una solución mixta de hexafluoroisopropanol (1 ml) y diclorometano (3 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración, y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida. El concentrado se sometió a azeotropía con diclorometano 6 veces y se secó en una bomba de vacío para obtener el compuesto del título 1-21A en forma de un sólido de color blanco (120 mg, rendimiento: 97%). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{27}H_{50}N_6O_{10}$: $[M+H]^+$ 619,4, Encontrado 619,4.

(1-21B) Síntesis de ácido 2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-[[2-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]acetil]amino]-4-oxobutanoil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acetil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acetil]amino]-3-terc-butoxi-propanoil]amino]acético (compuesto 1-21B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 85]



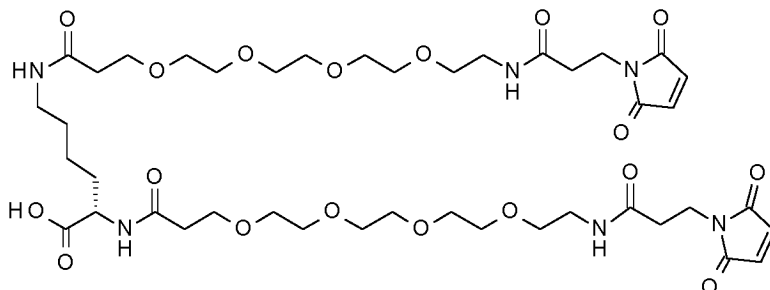
Se disolvieron ácido (2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (84,5 mg, 0,194 mmol) producido de acuerdo con el enfoque de J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 284-290 y HATU (73,8 mg, 0,194 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml). A la solución, se añadió N,N-diisopropiletilamina (66 µl, 0,388 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Esta solución se añadió al compuesto 1-21A (100 mg, 0,162 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes. Al compuesto obtenido, se añadió una solución mixta de ácido trifluoroacético (0,1 ml) y agua (0,9 ml), y la mezcla se agitó durante una noche. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto intermedio en forma de un sólido de color blanco (14,7 mg, 10 %).

El compuesto 1-2C (5,91 mg, 0,0212 mmol) y HATU (8,04 mg, 0,0212 mmol) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (1 ml). A la solución, se añadió N,N-diisopropiletilamina (9,05 µl, 0,0529 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Esta solución se añadió a una solución del compuesto intermedio obtenido (16,5 mg, 0,0176 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título 1-21B en forma de un sólido de color blanco (14,0 mg, rendimiento: 66%). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₄₉H₈₅N₁₁O₂₃: [M+H]⁺ 1197,6, Encontrado 1197,5.

<Ejemplo 1-22>

(1-22A) Síntesis de ácido (2S)-2,6-bis[3-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]hexanoico (compuesto 1-22A: compuesto de la siguiente fórmula)

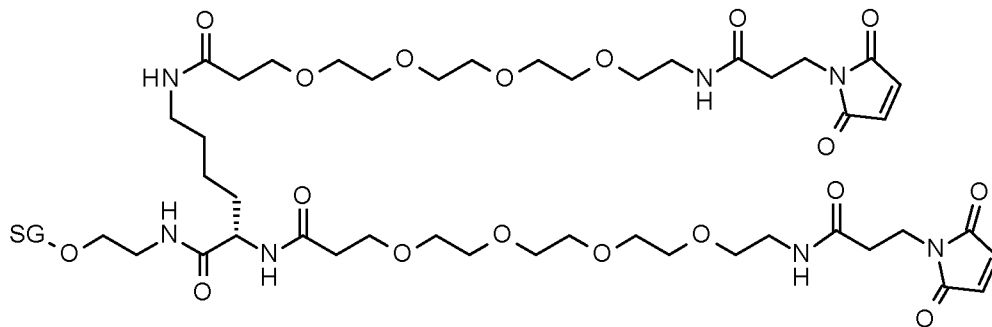
[Fórmula 86]



Se disolvió lisina (26,0 mg, 0,178 mmol) en un tampón fosfato 0,10 M (pH 7,0) (0,40 ml). A la solución, se añadió una solución de 3-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (200 mg, 0,390 mmol) en N,N-dimetilformamida (0,40 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2,0 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título 1-22A (106 mg, rendimiento: 63%). MS (ESI): Calc. para C₄₂H₆₅N₆O₁₈: [M-H]⁻ 941, Encontrado 941.

(1-22B) Síntesis de SG-Lys^{*}-[PEG(3)-Mal]₂ (compuesto 1-22B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 87]

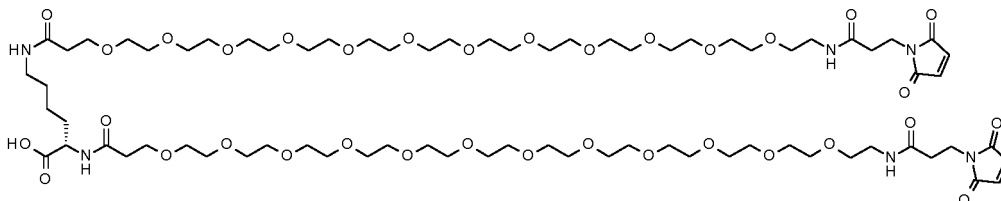


- 5 A una solución de el compuesto 1-22A (10,0 mg, 10,6 μmol) producido de ese modo, el compuesto SG-NH₂ (19,4 mg, 8,13 μmol) producido en (1-11B), y HATU (4,00 mg, 10,6 μmol) en N,N-dimetilformamida (1,0 ml), se añadió N,N-diisopropil-etilamina (8,80 μl , 51,7 μmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se añadió a una solución acuosa al 0,5 % de ácido trifluoroacético (6,0 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-Lys*-[PEG(3)-Mal]₂ (10,0 mg, rendimiento: 25%). ESI-TOF-MS: Calc. para C₁₂₈H₂₀₅N₁₃O₇₉: [M-2H]²⁻ 1595,0 (prom.), Encontrado 1595,0.

<Ejemplo 1-23>

- 10 (1-23A) Síntesis de ácido (2S)-2,6-bis[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoilamino]hexanoico (compuesto 1-23A: compuesto de la siguiente fórmula)

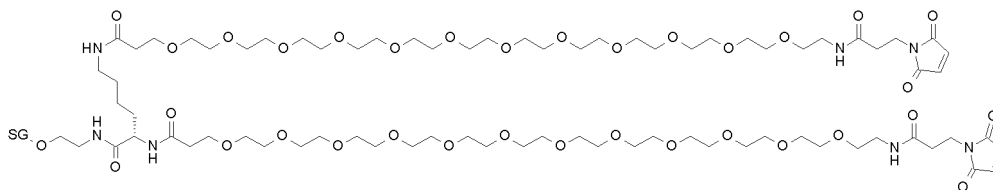
[Fórmula 88]



- 15 El compuesto del título 1-23A se obtuvo en forma de un aceite incoloro (36,0 mg, rendimiento: 41 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-22A) usando lisina (7,70 mg, 52,7 μmol) y 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoato de (2,5-dioxopirrolidín-1-ilo) (100 mg, 115 μmol). MS (ESI): Calc. para C₇₄H₁₂₉N₆O₃₄: [M-H]⁻ 1645, Encontrado 1645.

(1-23B) Síntesis de SG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂ (compuesto 1-23B: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 89]

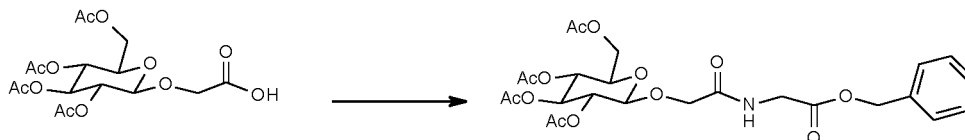


- 20 El compuesto del título SG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂ se obtuvo en forma de un aceite incoloro (14,0 mg, rendimiento: 34 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-22B) usando el compuesto 1-23A (19,0 mg, 11,5 μmol) y el compuesto SG-NH₂ (25,0 mg, 10,5 μmol) producido en (1-11B). ESI-TOF-MS: Calc. para C₁₈₀H₂₆₉N₁₃O₉₅: [M-2H]²⁻ 1947,4 (prom.), Encontrado 1947,3.

<Ejemplo 1-24>

(1-24A) Síntesis de 2-[[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]ácido oxiacético]amino]acetato de bencilo (compuesto 1-24A: producto de reacción de la siguiente fórmula)

[Fórmula 90]



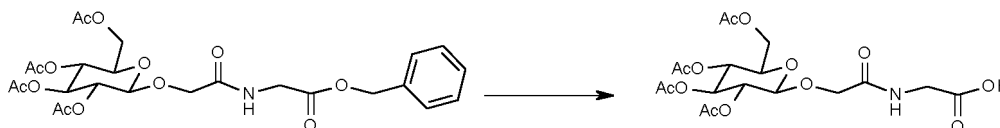
5 Se disolvió un compuesto conocido, ácido 2-[[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacético (Tetrahedron Asymmetry, 2008, 19, 1919-1933) (670 mg), en DMF (6 ml). A la solución, se añadieron HATU (630 mg) y DIPEA (0,57 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 minutos. Después, se añadió a ello clorhidrato de éster de bencilo de glicina (370 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con solución salina al 10 % dos veces y ácido clorhídrico 1 N una vez. Después de secado sobre sulfato sódico anhidro y filtración, el disolvente se retiró por destilación a presión reducida para obtener un producto en bruto. Este producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:acetato de etilo = 60:40-20:80, v/v) para obtener el compuesto del título 1-24A (840 mg, rendimiento: 62 %) en forma amorfa.

10 RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,38-7,35 (5H, m), 6,99-6,98 (1H, m a), 5,23-5,21 (3H, m), 5,11-5,04 (2H, m), 4,56 (1H, d, J = 7,8 Hz), 4,34 (1H, d, J = 15,1 Hz), 4,20-4,09 (5H, m), 3,73-3,71 (1H, m), 2,08 (3H, s), 2,07 (3H, s), 2,04 (3H, s), 2,03 (3H, s). ESI-LC-MS: Calc. para C₂₅H₃₁NO₁₃: [M+H]⁺ 554, Encontrado 554.

15

(1-24B) Síntesis de ácido 2-[[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidropiran-2-il]ácido oxiacético]amino]acético (compuesto 1-24B: producto de reacción de la siguiente fórmula)

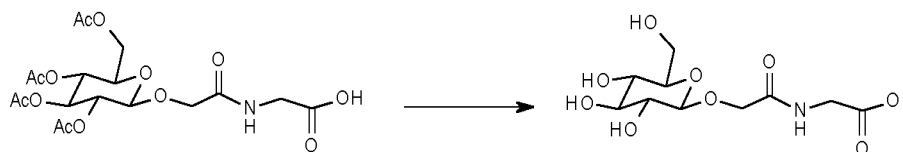
[Fórmula 91]



20 El compuesto del título 1-24B (700 mg, rendimiento: cuant.) se obtuvo en forma amorfa de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-2B) usando el compuesto 1-24A (840 mg). ESI-LC-MS: Calc. para C₁₈H₂₅NO₁₃: [M-H]⁻ 462, Encontrado 462. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,05-7,04 (1H, m a), 5,24 (1H, t, J = 9,5 Hz), 5,12-5,05 (2H, m), 4,58 (1H, d, J = 7,8 Hz), 4,35 (1H, d, J = 15,6 Hz), 4,27-4,05 (6H, m), 3,76-3,75 (1H, m), 2,08-2,04 (12H, m).

(1-24C) Síntesis de ácido 2-[[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]ácido oxiacético]amino]acético (compuesto 1-24C: producto de reacción de la siguiente fórmula)

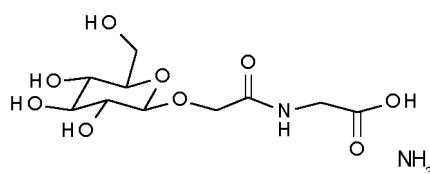
[Fórmula 92]



25 El compuesto del título 1-24C (286 mg, rendimiento: cuant.) se obtuvo en forma amorfa de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-2C) usando el compuesto 1-24B (450 mg). Este compuesto se usó directamente en la siguiente reacción. RMN ¹H (D₂O, TMS) δ: 4,54 (1H, d, J = 7,8 Hz), 4,43 (1H, d, J = 15,6 Hz), 4,31 (1H, d, J = 15,6 Hz), 3,91-3,89 (3H, m), 3,73 (1H, dd, J = 12,2, 5,4 Hz), 3,53-3,37 (4H, m). ESI-LC-MS: Calc. para C₁₀H₁₇NO₉: [M-H]⁻ 294, Encontrado 294.

30 (1-24D) Síntesis de sal de amonio del ácido 2-[[2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]ácido oxiacético]amino]acético (compuesto 1-24D: compuesto de la siguiente fórmula)

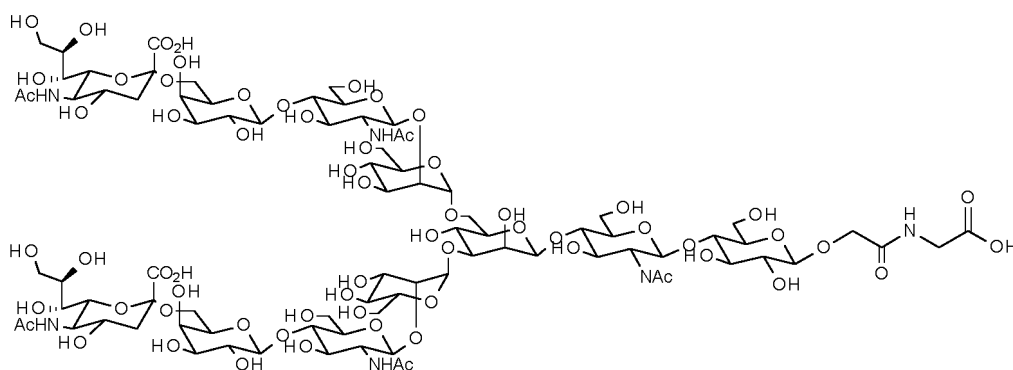
[Fórmula 93]



El compuesto del título 1-24D (325 mg) se obtuvo en forma amorfa de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-14A) usando el compuesto 1-24C (286 mg). Este compuesto se usó sin purificarse.

(1-24E) Síntesis de SG(Glc)-Gly-A (compuesto 1-24E: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 94]



5 Se disolvió sialilglucopéptido (191 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (1000 µl). A la solución, se
añadió después una solución acuosa (300 µl) de glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1
U/ml). El compuesto 1-24D (125 mg) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (370 µl) se añadió además
a ello, y la mezcla se hizo reaccionar a 28 °C durante 72 horas. La reacción se terminó mediante la adición de una
10 solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (3000 µl) a la solución de reacción, y el producto resultante se
separó y se purificó por HPLC en fase inversa (Inertsil ODS-3, GL Sciences Inc.) usando una solución acuosa al 0,1
% de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se
liofilizó para obtener el compuesto del título SG(Glc)-Gly-A (88 mg).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{86}H_{140}N_6O_{65}$: $[M+4H]^{4+}$ 1149,4 (prom.), Encontrado 1149,4

15 Además, se puede sintetizar un compuesto obtenido a partir del compuesto 1-24D mediante el reemplazo de la
estructura de azúcar con un azúcar distinto de Glc (por ejemplo, Man o Gal) por referencia a la reacción del Ejemplo
1-24. Se puede sintetizar una cadena glucídica alterada en el extremo reductor de SG(Man)-Gly, SG(Gal)-Gly, o
similar a través de la misma reacción de transglucosilación que en (1-24E) mediante el uso del compuesto
sintetizado de ese modo como compuesto aceptor.

20 Además, una cadena glucídica alterada en el extremo reductor de SG-NH₂, SG-I, SG-oxa, SG-A, o similar se puede
sintetizar de forma apropiada mediante la conversión apropiada de la estructura de azúcar del material de partida
(compuesto aceptor) en una deseada por referencia a la reacción del Ejemplo 1-24 en los procedimientos de los
Ejemplos 1-11, 1-12, 1-13, y 1-14.

[Ejemplo 2]

En lo sucesivo en el presente documento, el término individual "hANP" en una fórmula estructural representa que el
péptido hANP en el péptido modificado es hANP(1-28).

25 <Ejemplo 2-1> Síntesis de SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1)

(2-1A) Preparación de sal de hANP-TFA (trifluoroacetato)

La sal de hANP-TFA usada en las reacciones dadas a continuación se preparó de acuerdo con los siguientes
procedimientos:

Procedimiento de preparación 1

30 Se disolvió acetato de carperitida (acetato de hANP(1-28)) (100 mg) en agua destilada (4000 µl), y el producto
resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución

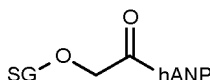
acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título (89,6 mg).

Procedimiento de preparación 2

5 Se disolvió acetato de carperitida (acetato de hANP(1-28)) (250 mg) en agua destilada (30 ml). A la solución, se añadió ácido trifluoroacético (600 µl), y la mezcla se liofilizó. Este compuesto se usó directamente sin purificarse adicionalmente.

(2-1B) Síntesis de SG-hANP (1-28) (compuesto 2-1: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 95]



(2-1B-1) Síntesis de sal de TFA de SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1)

10 A una solución del compuesto SG-A (97,7 mg) sintetizada en (1-14B) en N,N-dimetilformamida (1000 µl), se añadió una solución de HATU (16,3 mg) en N,N-dimetilformamida (1000 µl), se añadió después diisopropiletilamina (30 µl), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se usó inmediatamente en la siguiente reacción.

15 La sal de TFA de hANP (100 mg) preparada de acuerdo con los procedimientos de (2-1A) se disolvió en N,N-dimetilformamida (1200 µl) y agua destilada (320 µl). A la solución, se añadió diisopropiletilamina (22,5 µl). A esta solución, se añadió una solución que contenía éster activo preparada con antelación en N,N-dimetilformamida (2000 µl), y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (20 ml) con refrigeración en hielo. La materia insoluble se disolvió mediante la adición de ácido acético (2 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título sal de TFA de SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1) (91,0 mg).

20 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{213}H_{341}N_{51}O_{102}S_3$: $[M+H]^+$ 5342,2, Encontrado 5342,2

(2-1B-2) Síntesis de acetato de SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1)

25 A una solución del compuesto SG-A (790 mg) sintetizado en (1-14B) en N,N-dimetilformamida (18 ml), se añadió una solución de TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio) (104 mg) en N,N-dimetilformamida (2 ml), después se añadió diisopropiletilamina (241 µl), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se usó en la siguiente reacción.

30 Se disolvió acetato de carperitida (acetato de hANP(1-28)) (1000 mg) en N,N-dimetilformamida (12 ml) y agua destilada (3,2 ml). A la solución, se añadió diisopropiletilamina (241 µl). A esta solución, se añadió una solución que contenía éster activo preparada con antelación en N,N-dimetilformamida (20 ml), y la mezcla se agitó durante 1 hora. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello acetonitrilo (32 ml), y los precipitados se recogieron por filtración. Después de lavar con N,N-dimetilformamida/acetonitrilo (1/1) (30 ml) y acetonitrilo (100 ml), la materia sólida obtenida se secó a presión reducida. Esta materia sólida se disolvió en agua destilada, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido acético y una solución al 0,1 % de ácido acético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título acetato de SG-hANP(1-28) (compuesto 2-1) (1056 mg).

35 ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{213}H_{341}N_{51}O_{102}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1337,1 (prom.), Encontrado 1337,0

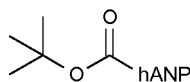
40 Como se ha mencionado anteriormente, el péptido modificado de interés también se sintetizó en forma de una sal de un tipo correspondiente a la sal del péptido hANP usado como material de partida. En los ejemplos posteriores, se adoptó la sal de TFA del péptido hANP, y el péptido modificado de interés se obtuvo en forma de una sal de TFA, a menos que se especifique lo contrario. En estos casos, el tipo de la sal no se describe particularmente. Todos los compuestos del título se pueden sintetizar como acetatos mediante la síntesis de acuerdo con los procedimientos de (2-1B-2).

<Ejemplo 2-2> Síntesis de hANP(1-28)-SG (compuesto 2-2)

(2-2A) Síntesis de Boc-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

45

[Fórmula 96]

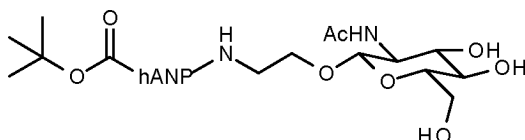


El acetato de hANP(1-28) (62,5 mg) se disolvió en agua destilada (1,3 ml). A la solución, se añadió una solución de dicarbonato de di-*t*-butilo (0,9 mg, 324,6 μ mol) en alcohol *terc*-butílico (400 μ l) a temperatura ambiente, después se añadió una solución acuosa (200 μ l) de trietilamina (13,6 μ l), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.

- 5 La materia insoluble se disolvió mediante la adición de agua destilada (6 ml), acetonitrilo (2 ml), y ácido acético (1 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título Boc-hANP(1-28) (59,9 mg).
MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{132}H_{211}N_{45}O_{41}S_3$: $[M+H]^+$ 3179,5, Encontrado 3179,7

- 10 (2-2B) Síntesis de Boc-hANP(1-28)-GlcNAc (compuesto de la siguiente fórmula)

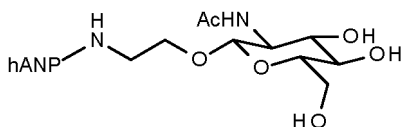
[Fórmula 97]



El Boc-hANP(1-28) (59,9 mg) producido en (2-2A) y el compuesto 1-7A (59,7 mg) se disolvieron en agua destilada (0,2 ml). A la solución, se añadieron una solución de HATU (35,8 mg) en dimetilformamida (2,0 ml) y trietilamina (15,8 μ l) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se añadió a una solución acuosa enfriada en hielo (5 ml) de ácido trifluoroacético (8,7 μ l), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título Boc-hANP(1-28)-GlcNAc (38,7 mg).

- 15 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{142}H_{229}N_{47}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3425,6, Encontrado 3426,0 (2-2C) Síntesis de hANP(1-28)-GlcNAc (compuesto de la siguiente fórmula)

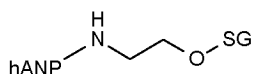
[Fórmula 98]



- 20 El Boc-hANP(1-28)-GlcNAc (38,7 mg) producido en (2-2B) se disolvió en una solución acuosa al 20 % de ácido trifluoroacético (5 ml) y ácido acético (1 ml), y la solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 7 horas. Se añadió a ello agua destilada (10 ml), y la mezcla se liofilizó. El producto en bruto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título hANP(1-28)-GlcNAc (21,8 mg).

- 25 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{137}H_{221}N_{47}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3325,6, Encontrado 3425,5 (2-2D) Síntesis de hANP(1-28)-SG (compuesto 2-2: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 99]



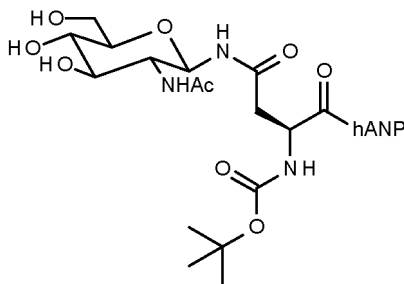
- 30 Al compuesto SG-Oxa producido en (1-12A) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (60 mM, 120 μ l), se añadió glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml, 48 μ l) a temperatura ambiente, después se añadió una solución del hANP(1-28)-GlcNAc (6,0 mg, 1,8 μ mol) producido en (2-2C) en dimetilsulfóxido (72 μ l) en dos porciones en un intervalo de 15 minutos a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 25 °C durante 2 horas.

La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (1,5 ml) a temperatura ambiente, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título hANP(1-28)-SG (compuesto 2-2) (6,2 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{213}H_{334}N_{52}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5327,3, Encontrado 5326,7.

<Ejemplo 2-3> Síntesis de (SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-3)

(2-3A) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

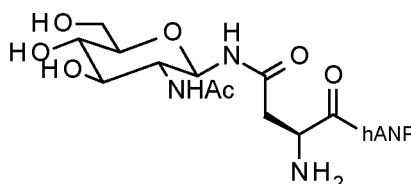
[Fórmula 100]



El compuesto del título Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (13,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando ácido (2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (42,4 mg, 0,0976 mmol) sintetizado de acuerdo con la descripción de J. Am. Chem. Soc., 1999, 121,284-290 y la sal de TFA de hANP(1-28) preparada a partir del acetato de hANP(1-28) (31,3 mg) mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{144}H_{230}N_{48}O_{48}S_3$: $[M+H]^+$ 3495,6, Encontrado 3496,5 (2-3B) Síntesis de (GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 101]

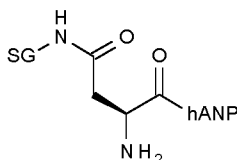


El compuesto del título (GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (5,83 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) a partir de Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (13,0 mg) producido en (2-3A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{139}H_{222}N_{48}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3396,6, Encontrado 3396,6

(2-3C) Síntesis de (SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula: compuesto 2-3)

[Fórmula 102]



El compuesto del título (GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-3) (2,17 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) a partir de (GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (4,90 mg) producido en (2-3B).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{215}H_{345}N_{53}O_{102}S_3$: $[M+H]^+$ 5398,3, Encontrado 5398,4.

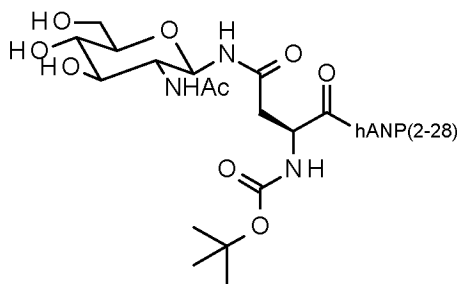
<Ejemplo 2-4> Síntesis de (SG-)Asn-hANP(2-28) (compuesto 2-4)

(2-4A) Preparación de hANP(2-28)

El acetato de hANP(1-28) (100 mg) se disolvió en una solución mixta de 1,5 % de dimetilalilamina, 60 % de piridina, y 38,5 % de agua (10,4 ml). A la solución, se añadió isocianato de fenilo (1,04 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se

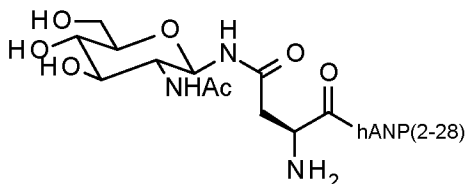
- añadieron a ello agua y ácido acético. Después de lavar con benceno tres veces, la fase acuosa se liofilizó. Se añadió a ello ácido trifluoroacético (2,6 ml), y la mezcla se agitó a 50 °C durante 30 minutos. Después, el trifluoroacético ácido se retiró por destilación. Al residuo, se añadieron agua y ácido acético. Después de lavar con benceno tres veces, la fase acuosa se liofilizó. El producto seco se disolvió en agua y ácido acético, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título ANP(2-28) en forma de un sólido de color blanco (50 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{124}H_{198}N_{44}O_{37}S_3$: $[M+H]^+$ 2992,4, Encontrado 2992,0 (2-4B) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 103]



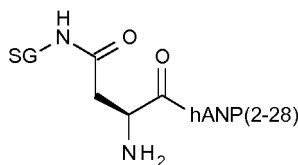
- 10 El compuesto del título Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (13,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-3A) usando el hANP(2-28) (25,0 mg) producido en (2-4A) en lugar de hANP(1-28). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{141}H_{225}N_{47}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3409,6, Encontrado 3409,5 (2-4C) Síntesis de (GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 104]



- 15 El compuesto del título (GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (6,86 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) a partir de Boc-(GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (13,0 mg) producido en (2-4B). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{136}H_{217}N_{47}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3309,5, Encontrado 3309,5 (2-4D) Síntesis de (SG-)Asn-hANP(2-28) (compuesto 2-4: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 105]

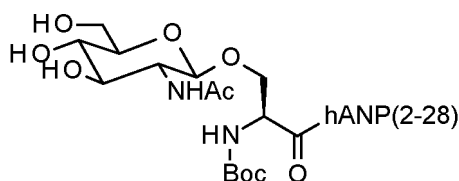


- 20 El compuesto del título (SG-)Asn-hANP(2-28) (compuesto 2-4) (3,80 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) a partir de (GlcNAc-)Asn-hANP(2-28) (5,75 mg) producido en (2-4C). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{212}H_{340}N_{52}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5313,4 (prom.), Encontrado 5314,7.

<Ejemplo 2-5> Síntesis de (SG-)Ser-hANP(2-28) (compuesto 2-5)

(2-5A) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 106]

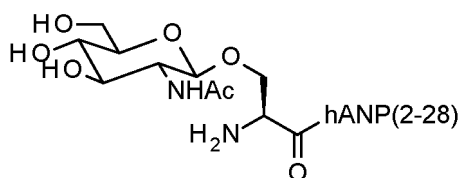


El compuesto del título Boc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (13,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-3A) usando el compuesto 1-1D (40,8 mg) y hANP(2-28) (25,0 mg) producido en (2-4A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{140}H_{224}N_{46}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3382,6, Encontrado 3382,7

(2-5B) Síntesis de (GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 107]

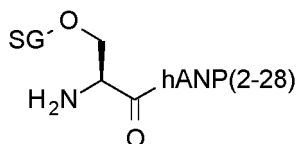


5 El compuesto del título (GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (6,36 mg) se obtuvo mediante la retirada de Boc de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) usando Boc-(GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (13,0 mg) producido en (2-5A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{135}H_{216}N_{46}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3282,5, Encontrado 3282,6

(2-5C) Síntesis de (SG-Ser)-hANP(2-28) (compuesto 2-5: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 108]



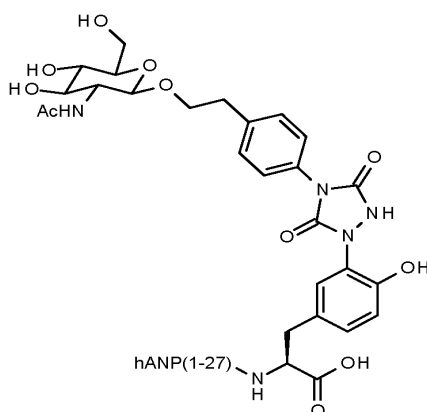
10 El compuesto del título (SG-)Ser-hANP(2-28) (compuesto 2-5) (4,40 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando (GlcNAc-)Ser-hANP(2-28) (5,47 mg) producido en (2-5B).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{211}H_{339}N_{51}O_{100}S_3$: $[M+H]^+$ 5284,2, Encontrado 5284,4.

<Ejemplo 2-6> Síntesis de hANP(1-27)-(SG-)Tyr (compuesto 2-6)

(2-6A) Síntesis de hANP(1-27)-(GlcNAc-)Tyr (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 109]

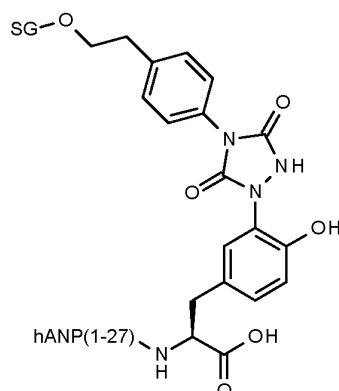


El compuesto 1-6D (30,6 mg) se disolvió en dimetilformamida (200 µl). A la solución, se añadió una solución de N-bromosuccinimida (11,5 mg) y piridina (5,2 µl) en dimetilformamida (125 µl) a 0 °C, y la mezcla se agitó durante 5 minutos.

- 5 El acetato de hANP(1-28) (50,0 mg) se disolvió en una solución de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0, 1 ml). A la solución, se añadió una solución de un derivado de triazoldiona preparada con antelación en dimetilformamida (325 µl) a 0 °C. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 horas, y después, el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título hANP(1 -27)-(Glc-NAc-)Tyr (9,8 mg).
- 10 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{145}H_{225}N_{49}O_{47}S_3$: $[M+H]^+$ 3501,6, Encontrado 3501,6

(2-6B) Síntesis de hANP(1-27)-(SG-)Tyr (compuesto 2-6: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 110]

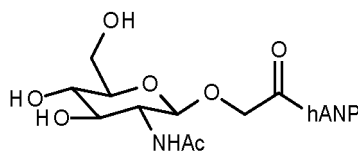


El compuesto del título hANP(1-27)-(SG-)Tyr (compuesto 2-6) (6,3 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando hANP(1-27)-(GlcNAc-)Tyr (8,3 mg) producido en (2-6A).
MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{221}H_{348}N_{54}O_{103}S_3$: $[M+H]^+$ 5503,3, Encontrado 5502,8.

- 15 <Ejemplo 2-7> Síntesis de SG-hANP(1-28)-SG (compuesto 2-7)

(2-7A) Síntesis de GlcNAc-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

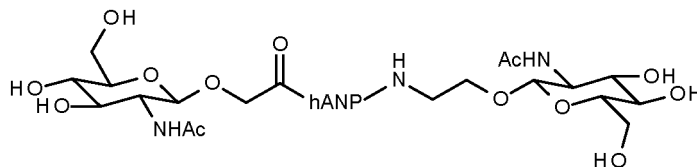
[Fórmula 111]



- 20 El compuesto 1-2C (25,0 mg) se disolvió en dimetilformamida (0,5 ml). A la solución, se añadió trietilamina (34 ml) a temperatura ambiente, después se añadió una solución de cloruro de dimetiltiofosfinoilo (12,0 mg) en dimetilformamida (0,5 ml) con refrigeración en hielo, y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Mientras tanto, se disolvió acetato de hANP(1-28) (25 mg) en dimetilformamida (1 ml) y agua destilada (0,32 ml). A la solución, se añadió trietilamina (25,3 µl) a temperatura ambiente, después se añadió una solución de éster activado preparada con antelación en dimetilformamida (433 µl) con refrigeración en hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se añadió una solución acuosa al 0,5 % enfrida en hielo de ácido trifluoroacético (5 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título GlcNAc-hANP(1-28) (17,8 mg).
- 25 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{137}H_{218}N_{46}O_{46}S_3$: $[M+H]^+$ 3340,5, Encontrado 3340,5 (2-7B) Síntesis de GlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (compuesto de la siguiente fórmula)

30

[Fórmula 112]

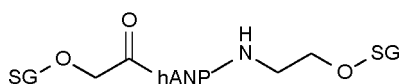


El compuesto del título GlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (10,0 mg) se obtuvo mediante la conexión de GlcNAc al extremo C-terminal de hANP de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2B) usando GlcNAc-hANP(1-28) (30,0 mg) producido en (2-7A) y el compuesto 1-7A.

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{147}H_{236}N_{48}O_{51}S_3$: $[M+H]^+$ 3586,7, Encontrado 3586,7

- 5 (2-7C) Síntesis de SG-hANP(1-28)-SG (compuesto 2-7: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 113]



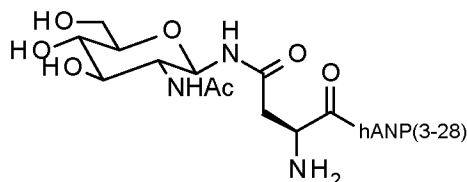
El compuesto del título SG-hANP(1-28)-SG (compuesto 2-7) (13,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando GlcNAc-hANP(1-28)-GlcNAc (6,0 mg) producido en (2-7B).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{299}H_{482}N_{58}O_{163}S_3$: $[M+H]^+$ 7590,0, Encontrado 7589,0.

<Ejemplo 2-8> Síntesis de (SG-)Asn-hANP(3-28) (compuesto 2-8)

- 10 (2-8A) Síntesis de (GlcNAc-)Asn-hANP(3-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 114]

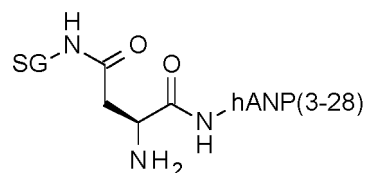


El aminoácido N-terminal del hANP(2-28) (32,0 mg) producido en (2-4A) se retiró mediante el procedimiento de (2-4A), de nuevo, para obtener hANP(3-28). El compuesto del título (GlcNAc-)Asn-hANP(3-28) (3,5 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en el Ejemplo 2-4 usando el hANP(3-28) obtenido en lugar de hANP(2-28).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{130}H_{208}N_{46}O_{43}S_3$: $[M+H]^+$ 3196,5, Encontrado 3196,7

- 15 (2-8B) Síntesis de (SG-)Asn-hANP(3-28) (compuesto de la siguiente fórmula: compuesto 2-8)

[Fórmula 115]



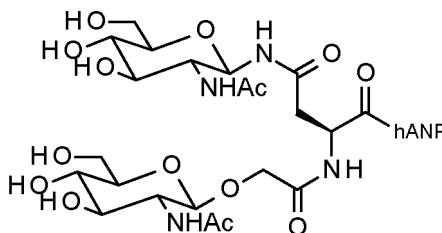
El compuesto del título (SG-)Asn-hANP(3-28) (compuesto 2-8) ((2,5 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando el GlcNAc-Asn-hANP(3-28) (3,5 mg) producido en (2-8A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{206}H_{329}N_{51}O_{99}S_3$: $[M+H]^+$ 5198,1, Encontrado 5198,3

<Ejemplo 2-9> Síntesis de SG-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-9)

- 20 (2-9A) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 116]

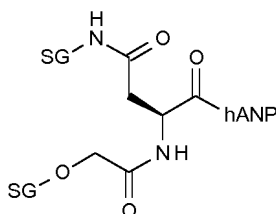


El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-hANP(1-28) (6,15 mg) se obtuvo mediante la conexión de GlcNAc al grupo amino de Asp de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-5B) usando el (GlcNAc)-Asn-hANP(1-28) (16,0 mg) producido en (2-3B).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{149}H_{237}N_{49}O_{53}S_3$: $[M+H]^+$ 3657,7, Encontrado 3658,1

- 5 (2-9B) Síntesis de SG-(SG)-Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-9: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 117]



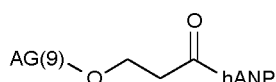
El compuesto del título SG-(SG)-Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-9) (6,7 mg) se obtuvo mediante el mismo enfoque que en 2-2D usando el compuesto SG-Oxa producido en (1-12A) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (60 mM, 168 μ l), glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml, 67 μ l), y el GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-hANP(1-28) (6,15 mg) producido en (2-9A).

- 10 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{301}H_{483}N_{59}O_{165}S_3$: $[M+H]^+$ 7661,0, Encontrado 7660,7.

<Ejemplo 2-10> Síntesis de AG(9)-hANP(1-28) (compuesto 2-10)

(2-10A) Síntesis de AG(9)-hANP(1-28) (compuesto 2-10: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 118]

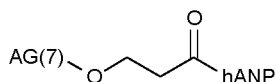


- 15 El SG-hANP(1-28) (21 mg) sintetizado en (2-1B) se disolvió en una solución de tampón acetato 0,2 M (pH 5,0) (1000 μ l). A la solución, se añadió después una solución acuosa (1000 μ l) de neuraminidasa ([E.C.3.2.1.18], Nacalai Tesque, Inc., 1 U/ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 17 horas. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2000 μ l). La materia insoluble se disolvió mediante la adición de ácido acético (200 μ l). Se combinaron dos lotes de esta solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG(9)-hANP(1-28) (compuesto 2-10) (33,8 mg).
- 20 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{191}H_{307}N_{49}O_{86}S_3$: $[M+H]^+$ 4760,0, Encontrado 4760,4.

<Ejemplo 2-11> Síntesis de AG(7)-hANP(1-28)

(2-11A) Síntesis de AG(7)-hANP(1-28) (compuesto 2-11: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 119]

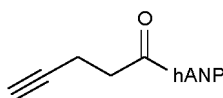


El AG(9)-hANP(1-28) (16 mg) sintetizado en (2-10A) se disolvió en agua destilada (1425 µl). A la solución, se añadieron después una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,25) (1500 µl) y una solución acuosa (75 µl) de β1-4 galactosidasa (New England BioLabs Japan Inc., 8000 U/ml), y la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 24 horas. Después de la finalización de la reacción, se añadió a ello una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (3000 ul). La materia insoluble se disolvió mediante la adición de ácido acético (300 µl), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG(7)-hANP(1-28) (compuesto 2-11) (11,7 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₇₉H₂₈₇N₄₉O₇₆S₃: [M+H]⁺ 4435,9, Encontrado 4435,8.

10 <Ejemplo 2-12> Síntesis de SG-triazol-hANP(1-28) (compuesto 2-12)

(2-12A) Síntesis de pentinoil-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

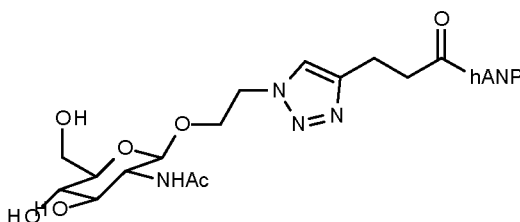
[Fórmula 120]



El compuesto del título Pentinoil-hANP(1-28) (26,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-7A) usando acetato de hANP(1-28) (50,0 mg) y ácido 4-pentinoico (10,0 mg, 101 µmol). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₃₂H₂₀₇N₄₅O₄₀S₃: [M]⁺ 3158,4, Encontrado 3158,0.

15 (2-12B) Síntesis de GlcNAC-triazol-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

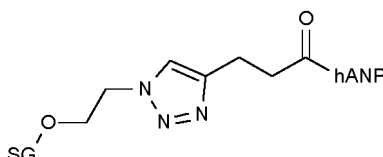
[Fórmula 121]



Al Pentinoil-hANP(1-28) (22,0 mg) producido en (2-12A), se añadieron en este orden una solución acuosa 30 mM de N-[(2R,3R,4R,5S,6R)-2-(2-azidoetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-3-il]acetamida (0,37 ml, 11,1 µmol), una solución acuosa 30 mM de ascorbato sódico (0,26 ml, 7,8 µmol), una solución acuosa 10 mM de sulfato de cobre (0,15 ml, 1,5 µmol) y un tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (12 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título GlcNAC-triazol-hANP(1-28) (15,0 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₄₂H₂₂₅N₄₉O₄₆S₃: [M+H]⁺ 3449,6, Encontrado 3449,6.

25 (2-12C) Síntesis de SG-triazol-hANP(1-28) (compuesto 2-12: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 122]

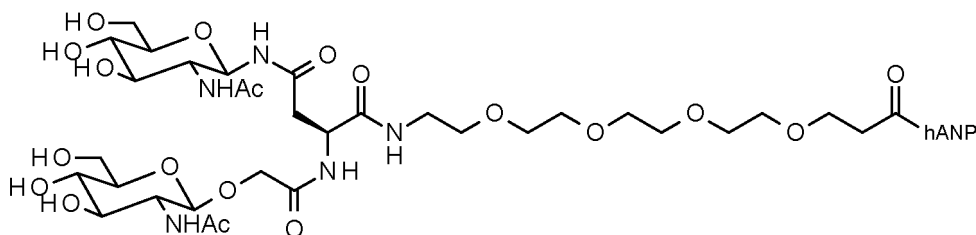


El compuesto del título SG-triazol-hANP(1-28) (compuesto 2-12) (9,3 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando el GlcNac-triazol-hANP(1-28) (8,0 mg) producido en (2-12B). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₂₁₈H₃₄₈N₅₄O₁₀₂S₃: [M+H]⁺ 5451,3, Encontrado 5451,1.

<Ejemplo 2-13> Síntesis de SG-(SG-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-13)

30 (2-13A) Síntesis de GlcNAC-(GlcNAC-Asn)-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 123]

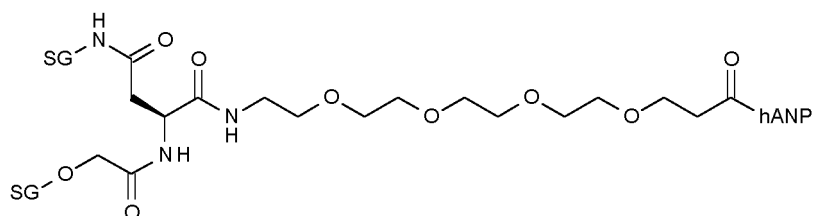


El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (12,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) a partir del compuesto 1-5B (9 mg) y la sal de TFA de hANP (16,6 mg) preparada mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{160}H_{258}N_{50}O_{58}S_3$: $[M+H]^+$ 3904,8, Encontrado 3904,5

- 5 (2-13B) Síntesis de SG-(SG)-Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-13: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 124]

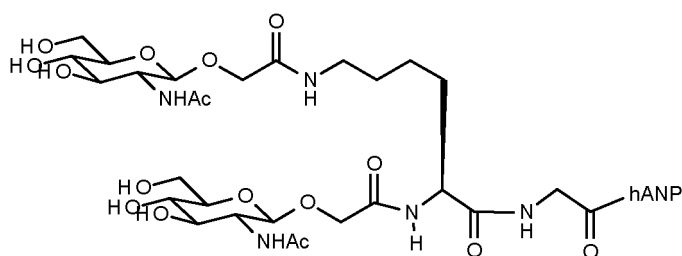


El compuesto del título SG-(SG)-Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-13) (6,40 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-9B) usando el GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (6,00 mg) producido en (2-13A). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{312}H_{504}N_{60}O_{170}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1979,0 (prom.), Encontrado 1978,5.

<Ejemplo 2-14> Síntesis de SG-(SG)-Lys-Gly-hANP(1-28) (compuesto 2-14)

- 10 (2-14A) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc)-Lys-Gly-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

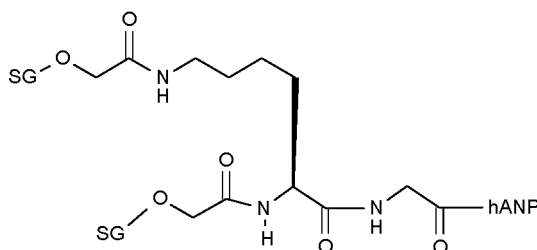
[Fórmula 125]



El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc)-Lys-Gly-hANP(1-28) (14,9 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-7A) usando acetato de hANP(1-28) (50,0 mg) y el compuesto 1-9D (29,0 mg, 40,0 μ mol). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{155}H_{249}N_{50}O_{55}S_3$: $[M+H]^+$ 3786,7, Encontrado 3786,8.

(2-14B) Síntesis de SG-(SG)-Lys-Gly-hANP(1-28) (compuesto 2-14: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 126]

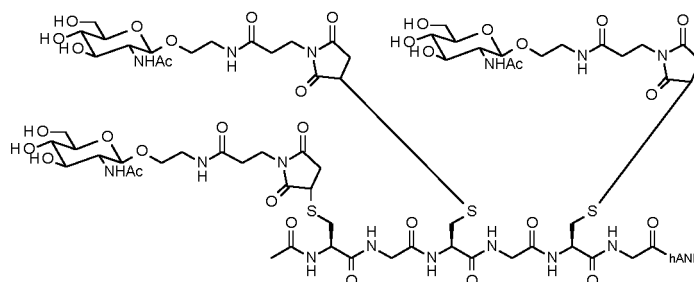


El compuesto del título SG-(SG-)Lys-Gly-hANP(1-28) (compuesto 2-14) (7,6 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando el GlcNAc-(GlcNAc-)Lys-Gly-hANP(1-28) (6,0 mg) producido en (2-14A). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{307}H_{498}N_{60}O_{167}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1949,4 (prom.), Encontrado 1949,2.

<Ejemplo 2-15> Síntesis de [(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (compuesto 2-15)

5 (2-15A) Síntesis de [(GlcNAc-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

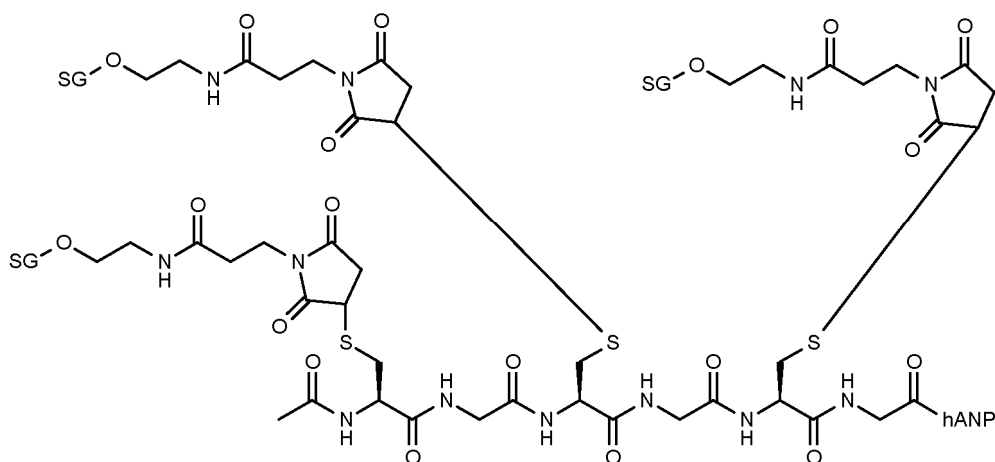
[Fórmula 127]



El compuesto del título [(GlcNAc-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (18,4 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando el compuesto 1-10B (27 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{195}H_{304}N_{60}O_{73}S_6$: $[M+H]^+$ 4847,0, Encontrado 4847,2

(2-15B) Síntesis de [(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (compuesto 2-15: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 128]

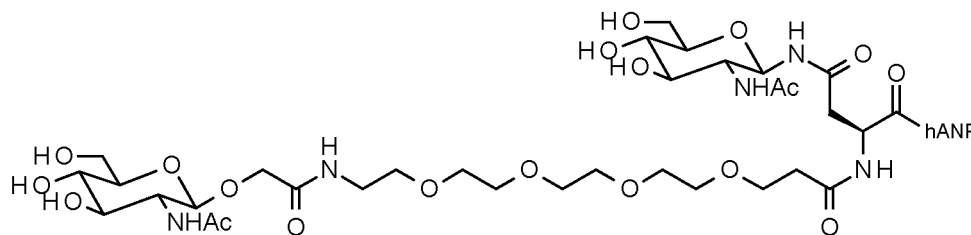


10 El compuesto del título [(SG-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) (compuesto 2-15) (5,23 mg) se obtuvo mediante el mismo enfoque que en 2-2D usando el compuesto SG-Oxa producido en (1-12A) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (60 mM, 118 μ l), glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml, 47 μ l), y el [(GlcNAc-)Cys-Gly]₃-hANP(1-28) producido en (2-15A).

15 ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{423}H_{673}N_{75}O_{241}S_6$: $[M+5H]^{5+}$ 2172,5 (prom.), Encontrado 2172,4 **<Ejemplo 2-16>** Síntesis de SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-16)

(2-16A) Síntesis de GlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

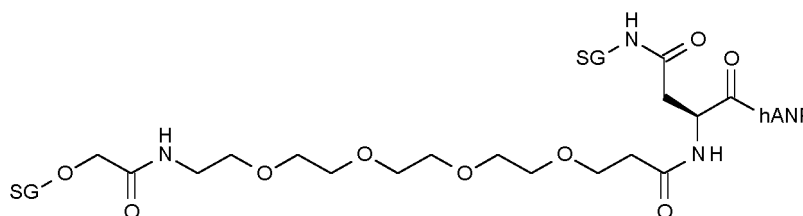
[Fórmula 129]



El compuesto del título GlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (9,10 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-7A) a partir del (GlcNAc-)Asn-hANP (19,0 mg) producido en (2-3B) y el compuesto 1-3A (8,8 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{160}H_{258}N_{50}O_{58}S_3$: $[M+H]^+$ 3904,8, Encontrado 3904,4

5 (2-16B) Síntesis de SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-16: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 130]



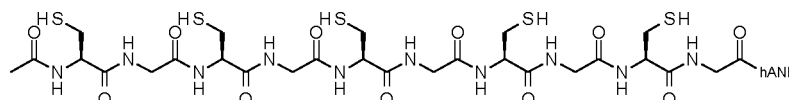
El compuesto del título SG-PEG(3)-(SG-)Asn-hANP(1-28) (compuesto 2-16) (3,10 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-9B) usando el GlcNAc-PEG(3)-(GlcNAc-)Asn-hANP(1-28) (3,50 mg) producido en (2-16A) a temperatura ambiente.

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{312}H_{504}N_{60}O_{170}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1978,1 (prom.), Encontrado 1978,8.

10 <Ejemplo 2-17> Síntesis de [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-17)

(2-17A) Síntesis de [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 131]



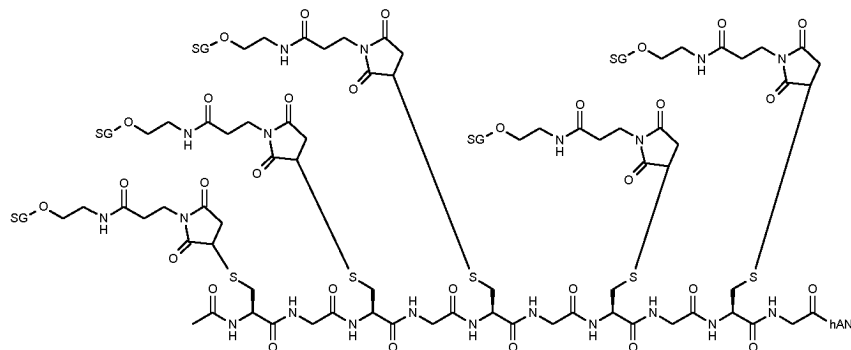
El compuesto intermedio (13,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) a partir del compuesto 1-8A (50,6 mg) y la sal de TFA de hANP preparada a partir del acetato de hANP (47,0 mg) mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A).

15 Al compuesto intermedio obtenido (13,0 mg), se añadió una solución mixta de ácido trifluoroacético (1,9 ml), agua (0,05 ml), y triisopropilsilano (0,05 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) en forma de un sólido de color blanco (3,2 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{154}H_{245}N_{50}O_{50}S_8$: $[M+H]^+$ 3921,6, Encontrado 3921,9

(2-17B) Síntesis de [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-17: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 132]

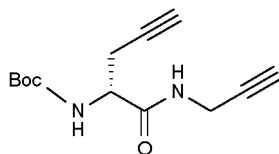


El [Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (3,00 mg) producido en (2-17A) y el compuesto SG-M (9,94 mg) producido en (1-13A) se disolvieron en una solución mixta de acetonitrilo (0,25 ml) y un tampón fosfato 0,2 M de pH 6,75 (0,25 ml), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó con agua, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes para obtener el compuesto del título [(SG-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-17) (8,19 mg).
ESI-TOF-MS: Calc. para C₆₁₉H₉₈₅N₉₅O₃₇₅S₈: [M+6H]⁶⁺ 2670,1 (prom.), Encontrado 2670,1.

<Ejemplo 2-18> Síntesis de [(SG₂-)Cys-Gly]₅-hANP(1-28) (compuesto 2-18)

(2-18A) Síntesis de N-[(1R)-1-(prop-2-ynilcarbamoil)but-3-ynil]carbamato de terc-butilo (compuesto de la siguiente fórmula)

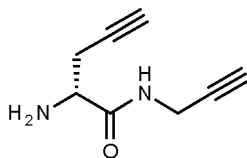
[Fórmula 133]



El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo pálido (480 mg, rendimiento: 96 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-9A) usando ácido (2R)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-pentinoico (430 mg, 2,02 mmol) y propargilamina (140 mg, 2,54 mmol).
MS (ESI): Calc. para C₁₃H₁₉N₂O₃: [M+H]⁺ 251, Encontrado 251.

(2-18B) Síntesis de trifluoroacetato de (2R)-2-amino-N-prop-2-ynil-pent-4-enamida (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 134]

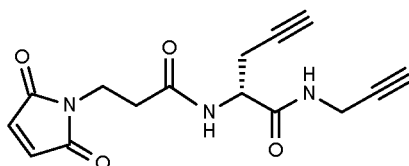


El compuesto del título se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo pálido (270 mg, rendimiento: 100 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-9B) usando el compuesto del título (250 mg, 1,00 mmol) obtenido en (2-18A).

RMN ¹H (CD₃OD) δ: 4,11-3,96 (3H, m), 2,87-2,74 (2H, m), 2,68-2,65 (2H, m).

(2-18C) Síntesis de (2R)-2-[3-(2,5-dioxopirrol-1-il)propanoilamino]-N-prop-2-ynil-pent-4-enamida (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 135]

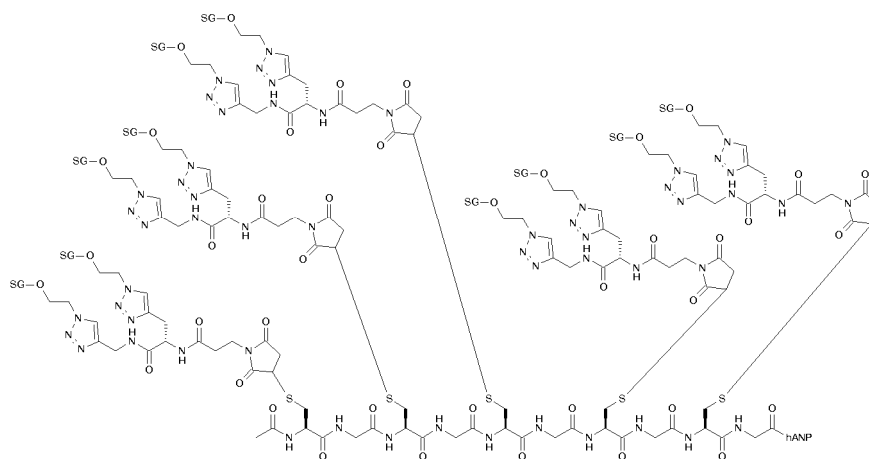


El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo pálido (220 mg, rendimiento: 73 %) de acuerdo con el mismo procedimiento que en (1-15A) usando el compuesto del título (270 mg, 1,00 mmol) obtenido en (2-18B).

MS (ESI): Calc. para $C_{15}H_{14}N_3O_4$: $[M-H]^-$ 300, Encontrado 300.

- 5 (2-18D) Síntesis de $[(SG_2-)Cys-Gly]_5$ -hANP(1-28) (compuesto 2-18: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 136]



El compuesto $SG-N_3$ (20,0 mg, 8,73 μ mol) producido en (1-18A) se disolvió en un tampón fosfato 0,10 M (pH 8,0) (0,840 ml). A la solución, se añadieron en este orden una solución 3,3 mM del compuesto del título obtenido en (2-18C) en terc-butanol (1,06 ml, 3,50 μ mol), una solución acuosa 50 mM de ascorbato sódico (0,420 ml, 21,0 μ mol) y una solución acuosa 10 mM de sulfato de cobre (0,420 ml, 4,20 μ mol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (12 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (Shiseido Co., Ltd., Proteonavi) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto intermedio (6,20 mg, 36 %).

- 15 El compuesto del título $[(SG_2-)Cys-Gly]_5$ -hANP(1-28) (compuesto 2-18) (8,42 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) a partir del $(Cys-Gly)_5$ -hANP(1-28) (1,76 mg) producido en (2-17A) y el compuesto intermedio sintetizado (10,3 mg).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{1089}H_{1730}N_{160}O_{690}S_8$: $[M-10H]^{10-}$ 2835,1 (prom.), Encontrado 2834,9.

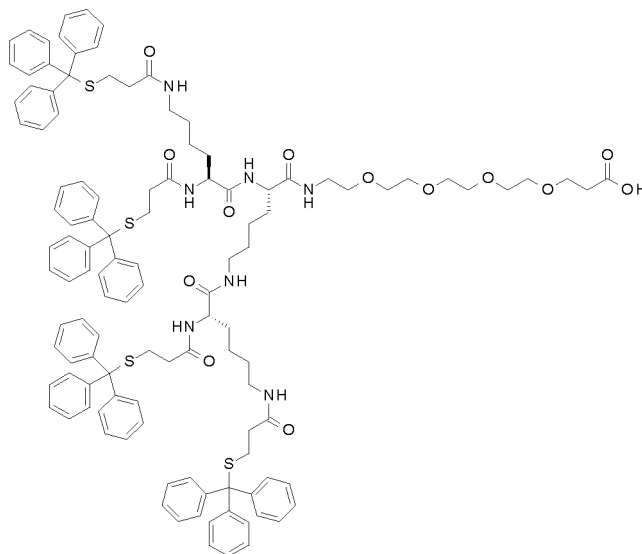
<Ejemplo 2-19> Síntesis de $SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys-]Lys-PEG(3)$ -hANP(1-28) (compuesto 2-19)

(2-19A) Síntesis de $TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(3)$ (compuesto de la siguiente fórmula)

20

25

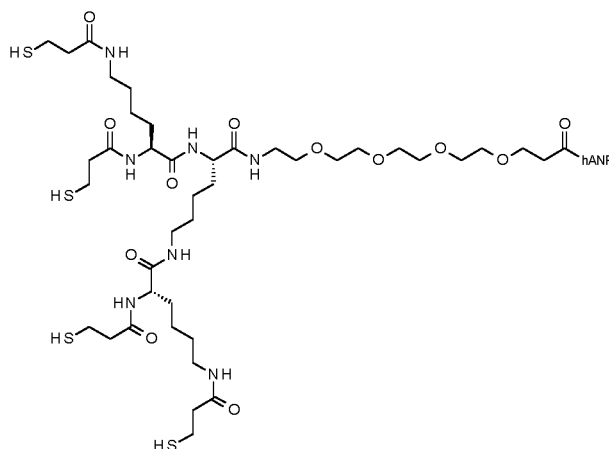
[Fórmula 137]



Una resina de 1,20 mmol/g de cloruro de 2-clorotritilo (250 mg, 0,300 mmol) se puso en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió diclorometano (5 ml) a ello, y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Después de la filtración, se añadió a ello una solución de ácido 3-[2[2[2[2-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propiónico (175 mg, 0,360 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (257 μ l, 1,50 mmol) en diclorometano (5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano (diclorometano: metanol:N,N-diisopropiletilamina = 85:10:5, v/v) tres veces, diclorometano tres veces, y N,N-dimetilformamida tres veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a la resina una solución de ácido (2S)-2,6-bis(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico (532 mg, 0,900 mmol), HATU (342 mg, 0,900 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (308 μ l, 1,80 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida tres veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a la resina una solución de ácido (2S)-2,6-bis(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)hexanoico (1060 mg, 1,80 mmol), HATU (684 mg, 1,80 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (616 μ l, 3,60 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 5 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se puso 1/3 de la cantidad (correspondiente a 0,100 mmol) de la resina obtenida en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió a ello una solución de ácido 3-tritilsulfanilpropiónico (418 mg, 1,20 mmol), HATU (456 mg, 1,20 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (411 μ l, 2,40 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración, se añadió de nuevo a la resina una solución de ácido 3-tritilsulfanilpropiónico (418 mg, 1,20 mmol), HATU (456 mg, 1,20 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (411 μ l, 2,40 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces y diclorometano tres veces. Se añadió a ello una solución mixta de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (2,5 ml) y diclorometano (7,5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La resina se retiró por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida. El concentrado se sometió a azeotropía con diclorometano 6 veces y se secó en una bomba de vacío para obtener el compuesto del título TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(3) en forma de un sólido de color pardo (170 mg).

(2-19B) Síntesis de HS-(HS-)Lys[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 138]



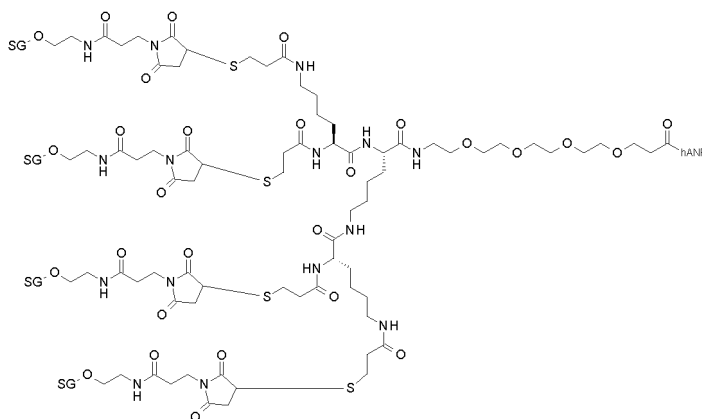
El compuesto intermedio (40 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17A) a partir del compuesto (66,1 mg) producido en (2-19A).

El compuesto del título HS-(HS-)Lys[HS-(HS-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (2,3 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17A) a partir del compuesto intermedio obtenido (7,0 mg).

5 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{168}H_{276}N_{52}O_{51}S_7$: $[M+H]^+$ 4062,9, Encontrado 4062,8

(2-19C) Síntesis de SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula: compuesto 2-19)

[Fórmula 139]



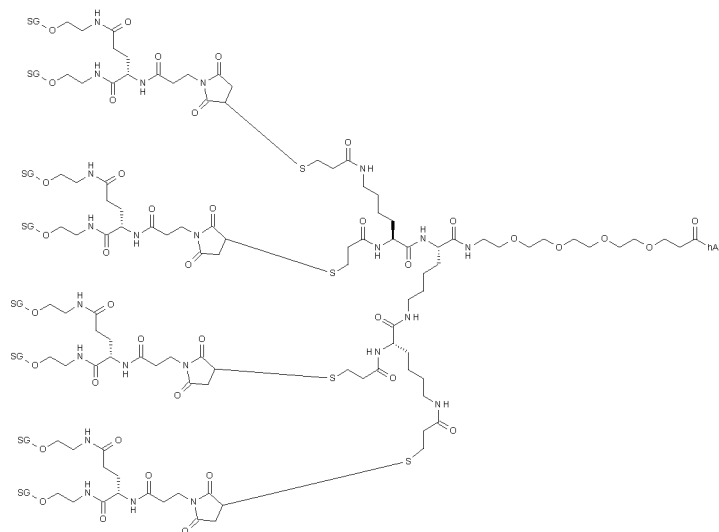
10 El compuesto del título [SG-(SG-)Lys-[SG-(SG-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-19) (5,31 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) a partir de HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (2,90 mg) producido mediante el enfoque de (2-19B).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{540}H_{868}N_{84}O_{311}S_7$: $[M+7H]^{7+}$ 1963,4 (prom.), Encontrado 1963,4.

<Ejemplo 2-20> Síntesis de [SG₂-(SG₂-)Lys-[SG₂-(SG₂-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-20)

(2-20A) Síntesis de SG₂-(SG₂-)Lys-[SG₂-(SG₂-)Lys]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-20: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 140]

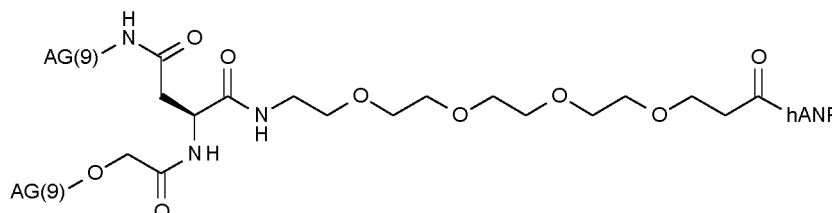


El compuesto del título SG₂-(SG₂-)Lys-[SG₂-(SG₂-)Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-20) (4,79 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) a partir del HS(HS-)-Lys-[HS-(HS-)-Lys-]Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (2,20 mg) producido en (2-19B) y el compuesto SG-(SG-)-Gln*-Mal (12,1 mg) producido en (1-15C). ESI-TOF-MS: Calc. para C₉₀₄H₁₄₆₀N₁₁₆O₅₆₇S₇: [M+8H]⁸⁺ 2907,3 (prom.), Encontrado 2907.

5 <Ejemplo 2-21> Síntesis de AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-21)

(2-21A) Síntesis de AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-21: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 141]

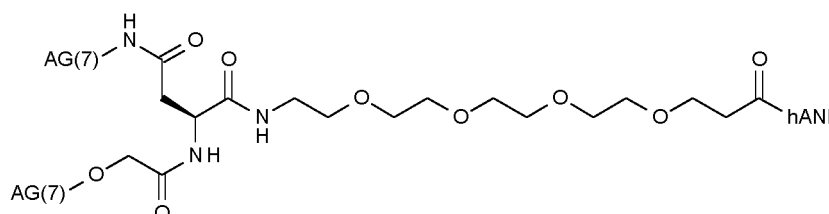


El compuesto del título AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-21) (8,2 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-10A) usando el SG-(SG-Asn)-PEG-hANP(1-28) (16 mg) sintetizado en (2-13B). ESI-TOF-MS: Calc. para C₂₆₈H₄₃₆N₅₆O₁₃₈S₃: [M+4H]⁴⁺ 1687,7, Encontrado 1687,4.

10 <Ejemplo 2-22> Síntesis de AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-22)

(2-22A) Síntesis de AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-22: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 142]

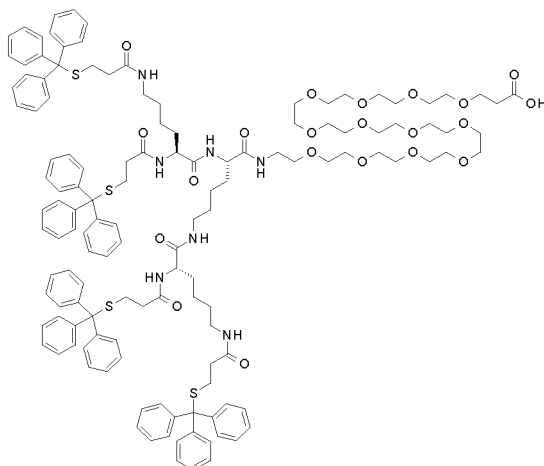


El compuesto del título AG(7)-(AG(7)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-22) (6,6 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-11A) usando el AG(9)-(AG(9)-)Asn-PEG(3)-hANP(1-28) (8 mg) sintetizado en (2-21A). ESI-TOF-MS: Calc. para C₂₄₄H₃₉₆N₅₆O₁₁₈S₃: [M+4H]⁴⁺ 1525,6, Encontrado 1525,4.

<Ejemplo 2-23> Síntesis de SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-23)

(2-23A) Síntesis de TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

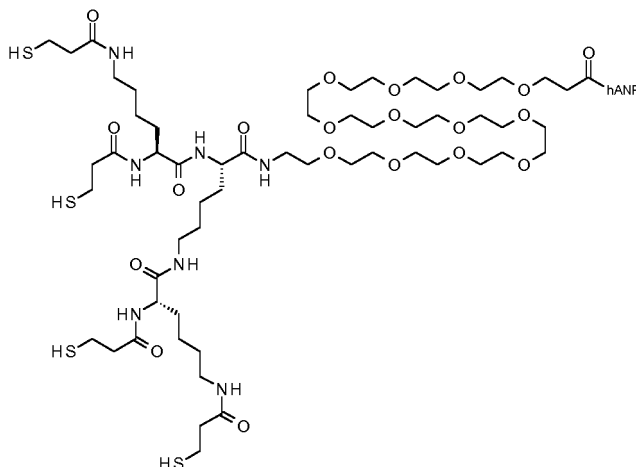
[Fórmula 143]



5 El compuesto del título TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (135 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-19A) a partir del ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propiónico (202 mg).

(2-23B) Síntesis de HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 144]

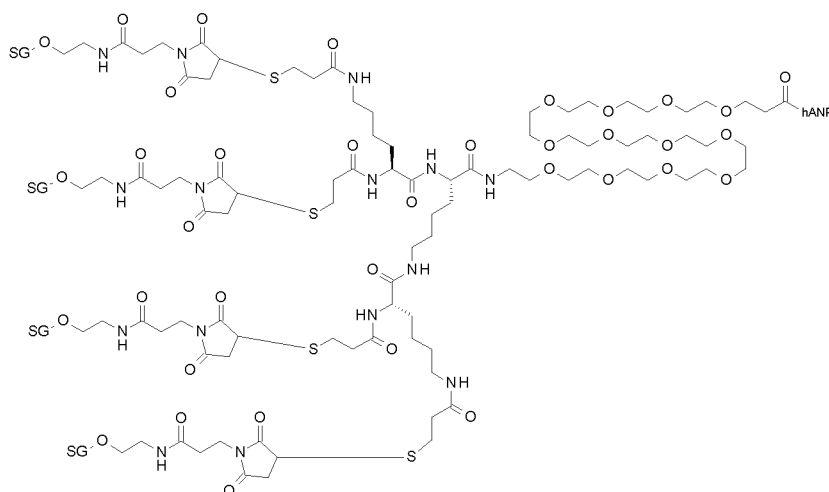


10 El compuesto del título HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (12,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17A) a partir del TrS-(TrS-)Lys-[TrS-(TrS-)Lys-]Lys-PEG(11)-CO₂H (45,3 mg) producido en (2-23A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₈₄H₃₀₈N₅₂O₅₉S₇: [M+H]⁺ 4415,1, Encontrado 4416,1

(2-23C) Síntesis de SG₄-Lys₃-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-23: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 145]

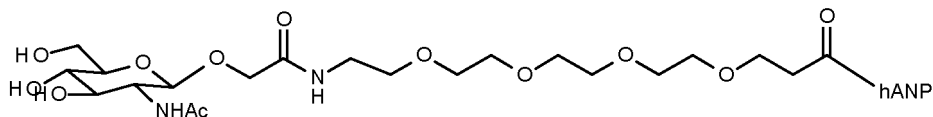


El compuesto del título SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-[SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-23) (4,40 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) a partir del HS-(HS-)Lys-[HS-(HS-)Lys-]Lys-PEG(11)-hANP(1-28) (3,16 mg) producido en (2-23B).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{556}H_{900}N_{84}O_{319}S_7$: $[M+6H]^{6+}$ 2349,3 (prom.), Encontrado 2349,2.

- 5 **<Ejemplo 2-24>** Síntesis de SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (compuesto 2-24) (2-24A) Síntesis de GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 146]



El compuesto del título GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (25,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-7A) usando el hANP(1-28) sal de TFA (33,0 mg) producido en (2-1A) y el compuesto 1-3A(13,0 mg, 24,7 μ mol). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{148}H_{240}N_{47}O_{51}S_3$: $[M+H]^+$ 3587,7, Encontrado 3587,6.

- 10 (2-24B) Síntesis de GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 147]



El compuesto del título GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (3,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-2B) usando el GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (21,0 mg) producido en (2-24A) y el compuesto 1-19B (46 mg, 73,6 μ mol).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{169}H_{278}N_{50}O_{61}S_3$: $[M+H]^+$ 4080,9, Encontrado 4080,9.

- 15 (2-24C) Síntesis de SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (compuesto 2-24: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 148]

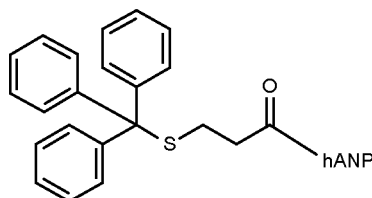


El compuesto del título SG-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-SG (compuesto 2-24) (5,5 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) usando el GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28)-PEG(3)-GlcNAc (4,0 mg) producido en (2-24B). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{321}H_{528}N_{60}O_{173}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 2023,0 (prom.), Encontrado 2022,8.

<Ejemplo 2-25> Síntesis de SG-tioacetamida-hANP(1-28) (compuesto 2-25)

(2-25A) Síntesis de TrS-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 149]

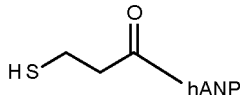


Se disolvió ácido 3-tritilsulfanilpropiónico (2,24 mg, 6,43 μmol) en dimetilformamida (100 μl). A la solución, se añadió trietilamina (1,79 μl , 12,8 μmol) a temperatura ambiente, después se añadió una solución de cloruro de dimetilfosfinoilo (0,83 mg, 6,46 μmol) en dimetilformamida (60 μl) con refrigeración en hielo, y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Mientras tanto, la sal de TFA de hANP(1-28) (10 mg) se disolvió en dimetilformamida (200 μl) y agua destilada (60 μl). A la solución, se añadió trietilamina (4,2 μl) a temperatura ambiente, después se añadió una solución de éster activo preparada con antelación en dimetilformamida (160 μl) con refrigeración en hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La solución de reacción se añadió a una solución acuosa al 0,5 % enfiada en hielo de ácido trifluoroacético (2 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título TrS-hANP(1-28) (5,77 mg).

ESI-TOF-MS: Calc. para $\text{C}_{149}\text{H}_{221}\text{N}_{45}\text{O}_{40}\text{S}_4$: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1138,0 (prom.), Encontrado 1137,8

(2-25B) Síntesis de HS-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 150]

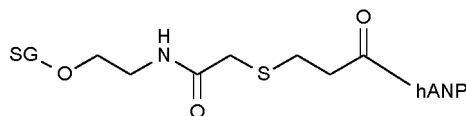


El TrS-hANP(1-28) (5,77 mg) sintetizado en (2-25A) se disolvió en una solución de ácido trifluoroacético/agua destilada/triisopropilsilano (90/5/5), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la finalización de la reacción, la materia insoluble se disolvió mediante la adición de una solución de agua destilada/ácido acético (10/1) (3 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título HS-hANP(1-28) (2,88 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $\text{C}_{130}\text{H}_{207}\text{N}_{54}\text{O}_{40}\text{S}_4$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 3167,4, Encontrado 3167,7

(2-25C) Síntesis de SG-tioacetamida-hANP(1-28) (compuesto 2-25: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 151]

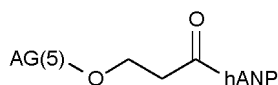


El HS-hANP(1-28) (2,88 mg) sintetizado en (2-25B) y el compuesto SG-I (2,66 mg) sintetizado en (1-11C) se disolvieron en dimetilformamida (300 μl). A la solución, se añadió diisopropiletamina (0,77 μl), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la finalización de la reacción, la materia insoluble se disolvió mediante la adición de una solución de agua destilada/ácido acético (10/1) (3 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-tioacetamida-hANP(1-28) (compuesto 2-25) (2,90 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $\text{C}_{218}\text{H}_{350}\text{N}_{52}\text{O}_{103}\text{S}_4$: $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1369,9 (prom.), Encontrado 1369,6.

<Ejemplo 2-26> Síntesis de AG(5)-hANP(1-28) (compuesto 2-26)

(2-26A) Síntesis de AG(5)-hANP(1-28) (compuesto 2-26: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 152]



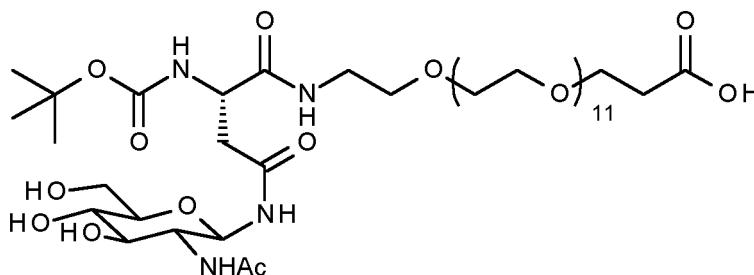
El trifluoroacetato del GlcNAc-hANP sintetizado en (2-7A) se reemplazó con otra sal mediante el uso de una resina de intercambio iónico (Dowex 1x8), y el acetato de GlcNAc-hANP resultante se usó en la siguiente reacción.

El compuesto AG(5)-P (18 mg) sintetizado en (1-17C) se disolvió en una solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,75, 160 μ l). A la solución, se añadió después una solución de glicosintasa (Endo-M-N175Q, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/ml, 64 μ l) y acetato (8,0 mg) del hANP-GlcNAc sintetizado en (2-7A) en dimetilsulfóxido (96 μ l), y la mezcla se hizo reaccionar a 25 °C durante 3 horas. La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (1,5 ml) a temperatura ambiente, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título AG(5)-hANP(1-28) (compuesto 2-26) (5,6 mg).
ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{163}H_{261}N_{47}O_{66}S_3$: $[M+3H]^{3+}$ 1345,1 (prom.), Encontrado 1344,6.

<Ejemplo 2-27> Síntesis de SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-27)

(2-27A) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 153]

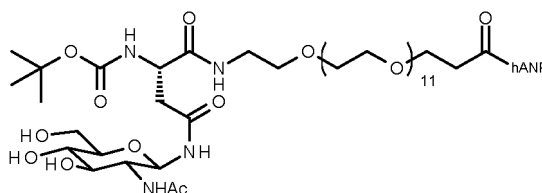


Se disolvieron ácido (2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (187 mg, 0,43 mmol) producido de acuerdo con la descripción de J. Am. Chem. Soc., 1999, 121,284-290 y HATU (163 mg, 0,43 mmol) en N,N-dimetilformamida (3,0 ml). A la solución, se añadió diisopropiletilamina (150 μ l, 0,86 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 3 minutos. Esta solución de reacción se añadió al ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (0,22 g, 0,36 mmol) producido en (1-4A) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta mezcla de reacción se añadió gota a gota a un disolvente mixto enfriado en hielo de agua destilada (3 ml) y ácido acético (100 μ l) y se disolvió en el mismo, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-CO₂H (210 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{44}H_{82}N_4O_{23}$: $[M+K]^+$ 1073,6, Encontrado 1073,5

(2-27B) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 154]



El Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-CO₂H (7,3 mg, 7,1 μ mol) producido en (2-27A) se disolvió en N,N-dimetilformamida (150 μ l). A la solución, se añadió una solución de trietilamina (5,9 μ l, 43 μ mol) y cloruro de dimetiltiofosfinoilo (1,7 mg, 21 μ mol) en N,N-dimetilformamida (50 μ l) con refrigeración en hielo. Esta solución de reacción se calentó a

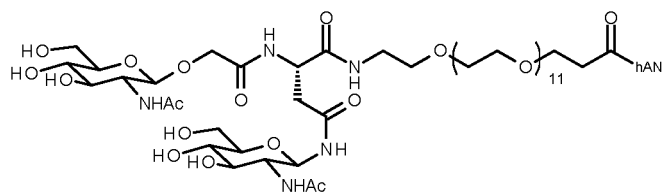
temperatura ambiente mientras se agitaba durante 1,5 horas. Esta solución de reacción se añadió con refrigeración en hielo a una solución de la sal de TFA de hANP (36 mg, 60 % p/p, 7,1 μ mol) preparada de acuerdo con los procedimientos de (2-1A) y trietilamina (14 μ l, 99 μ mol) disuelta en un disolvente mixto de N,N-dimetilformamida (1500 μ l) y agua destilada (300 μ l) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 1 día.

5 Esta solución de reacción se añadió a una solución acuosa al 0,2 % v/v enfriada en hielo de ácido trifluoroacético (8,3 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-CO₂H (14,8 mg).

10 ESI-TOF-MS: Calc. para C₁₇₁H₂₈₃N₄₉O₆₁S₃: [M+2H]²⁺ 2049,8 (prom.), Encontrado 2049,5

(2-27C) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 155]



El Boc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (14,8 mg) producido en (2-27B) se disolvió en una solución acuosa al 33 % v/v de ácido trifluoroacético (1,0 ml), y la solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta solución de reacción se añadió a un disolvente mixto enfriado en hielo de agua destilada (9,5 ml) y ácido acético (0,5 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto intermedio (10,2 mg).

15

El ácido 2-[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxiacético (1,4 mg, 5,1 μ mol) producido en (1-2C) se disolvió en N,N-dimetilformamida (150 μ l). A la solución, se añadieron trietilamina (2,1 μ l, 15 μ mol) y cloruro de dimetilfosfinito (0,98 mg, 7,7 μ mol) con refrigeración en hielo. Esta solución de reacción se calentó a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 1,5 horas. Esta solución de reacción se añadió con refrigeración en hielo a una solución del compuesto intermedio obtenido (10 mg, 2,6 μ mol) y trietilamina (5,0 μ l, 36 μ mol) disuelta en un disolvente mixto de N,N-dimetilformamida (1500 μ l) y agua destilada (3 00 μ l) y la mezcla se calentó a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 3 días. Esta solución de reacción se añadió a una solución acuosa al 0,2 % v/v enfriada en hielo de ácido trifluoroacético (8,5 ml), y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (9,0 mg).

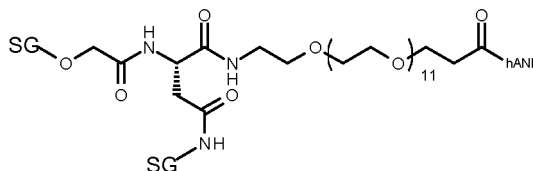
20

25

ESI-TOF-MS: Calc. para C₁₇₆H₂₉₀N₅₀O₆₆S₃: [M-2H]²⁻ 2128,3 (prom.), Encontrado 2128,0

30 (2-27D) Síntesis de SG-(SG-Asn)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-27: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 156]



Al compuesto SG-Oxa producido en (1-12A) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (60 mM, 188 μ l), se añadió Endo-M-N175Q (1 U/ml, 100 μ l) a temperatura ambiente, después se añadió una solución del hANP-GlcNAc (8,0 mg, 1,9 μ mol) producido en (2-27D) en dimetilsulfóxido (120 μ l) en dos porciones en un intervalo de 15 minutos a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 25 °C durante 1 día. La reacción se terminó mediante la adición de un disolvente mixto de una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (4,5 ml) y ácido acético (0,5 ml) a temperatura ambiente, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-(SG-)Asn-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-27) (3,4 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para C₃₂₈H₅₃₆N₆₀O₁₇₈S₃: [M+5H]⁵⁺ 1653,8 (prom.), Encontrado 1653,7.

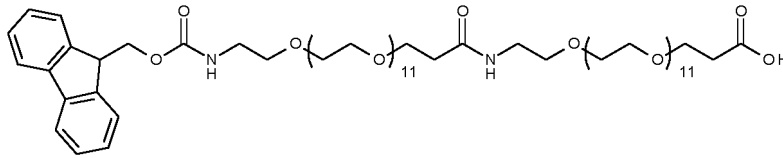
35

40

<Ejemplo 2-28> Síntesis de SG-(SG-)Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-28)

(2-28A) Síntesis de Fmoc-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 157]

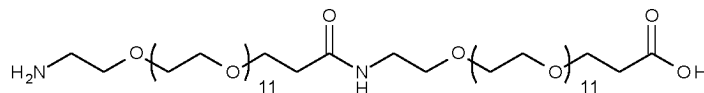


Se disolvieron ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (350 mg, 0,42 mmol) y HATU (192 mg, 0,50 mmol) en N,N-dimetilformamida (3,0 ml). A la solución, se añadió diisopropiletilamina (176 μl, 1,01 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante 3 minutos. Esta solución de reacción se añadió al ácido 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propanoico (259 mg, 0,42 mmol) producido en (1-4A) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta mezcla de reacción se añadió gota a gota a un disolvente mixto enfriado en hielo de agua destilada (3 ml) y ácido acético (117 μl) y se disolvió en el mismo, y la solución se diluyó además con un disolvente mixto de N,N-dimetilformamida (3,0 ml) y agua destilada (15 ml). El producto resultante se separó y se purificó a partir de la solución por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título Fmoc-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (399 mg).

ESI-TOF-MS: Calc. para C₆₉H₁₁₈N₂O₂₉: [M-H]⁻ 1437,8, Encontrado 1437,8

(2-28B) Síntesis de H₂N-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 158]

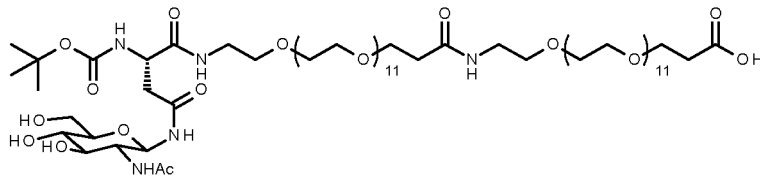


El compuesto del título H₂N-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (77 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-4A) a partir del Fmoc-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (250 mg) producido en (2-28A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para C₅₄H₁₀₈N₂O₂₇: [M+H]⁺ 1217,7, Encontrado 1217,9

(2-28C) Síntesis de Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

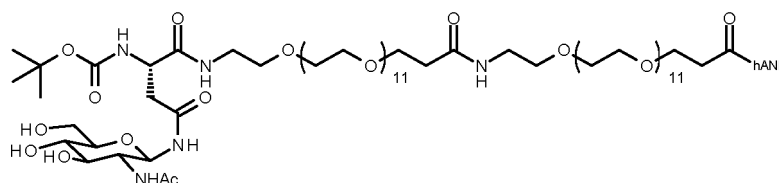
[Fórmula 159]



El compuesto del título Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (58 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-27A) a partir de ácido (2S)-4-[[[(2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropirán-2-il]amino]-2-(terc-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoico (32 mg, 74 μmol) producido de acuerdo con la descripción de J. Am. Chem. Soc., 1999, 121,284-290 y el H₂N-PEG(11)-PEG(11)-CO₂H (76 mg) producido en (2-28B). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₇₁H₁₃₅N₅O₃₆: [M+K]⁺ 1673,0, Encontrado 1672,9

(2-28D) Síntesis de Boc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 160]

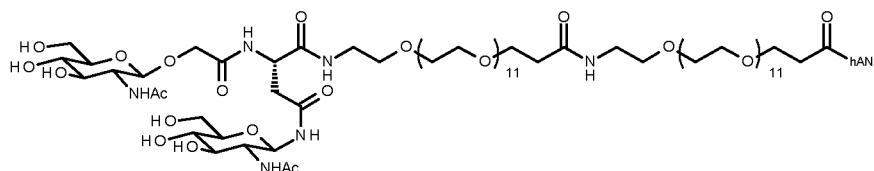


El compuesto del título Boc-(GlcNAc-)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (35 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-27B) usando el Boc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-COOH (29 mg, 18 μ mol) producido en (2-28C) y el hANP(1-28) sal de TFA (50 mg, 60 % p/p, 9,7 μ mol) producido en (2-1A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{198}H_{336}N_{50}O_{74}S_3$: $[M+H]^+$ 4695,3, Encontrado 4697,5

- 5 (2-28E) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 161]

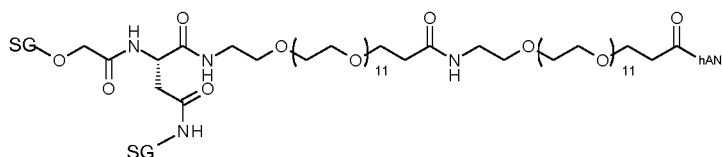


El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (16 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-27C) a partir del Boc-(GlcNAc-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (35 mg, 7,4 μ mol) producido en (2-28D).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{203}H_{343}N_{51}O_{79}S_3$: $[M+H]^+$ 4859,4 (prom.), Encontrado 4858,4 -TOF-MS: Calc. para $C_{203}H_{343}N_{51}O_{79}S_3$: $[M+H]^+$ 4859,4 (prom.), Encontrado 4858,4

- 10 (2-28F) Síntesis de SG-(SG-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-28: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 162]



El compuesto del título SG-(SG-Asn)-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-28) (13 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-27D) a partir del compuesto SG-Oxa producido en (1-12A) en una solución de tampón fosfato 0,2 M (60 mM, 190 μ l) y el GlcNAc-(GlcNAc)-Asn-PEG(11)-PEG(11)-hANP(1-28) (16 mg, 3,2 μ mol) producido en (2-28F).

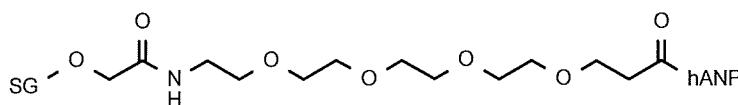
ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{355}H_{589}N_{61}O_{191}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 2217,0 (prom.), Encontrado 2216,9.

- 15

<Ejemplo 2-29> Síntesis de SG-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-29)

(2-29A) Síntesis de SG-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-29: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 163]



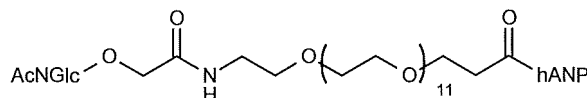
- 20 El compuesto del título SG-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-29) (12,32 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-14B) a partir del GlcNAc-PEG(3)-hANP(1-28) (15,0 mg) producido en (2-24A).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{224}H_{362}N_{52}O_{107}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1399,0 (prom.), Encontrado 1398,3.

<Ejemplo 2-30> Síntesis de SG-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-30)

(2-30A) Síntesis de GlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 164]

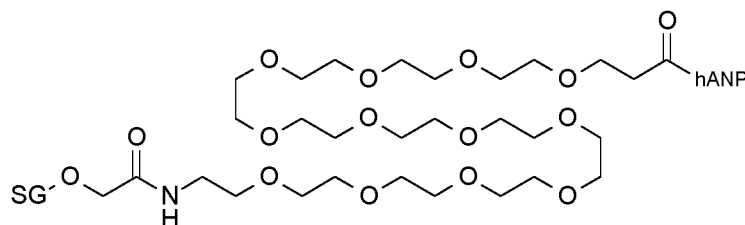


El compuesto del título GlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (33,7 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-7A) usando la sal de TFA de hANP(1-28) (43,9 mg) y el compuesto 1-4B (15,0 mg).

5 MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{164}H_{271}N_{47}O_{59}S_3$: $[M+H]^+$ 3939,9, Encontrado 3939,8

(2-30B) Síntesis de SG-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-30; compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 165]

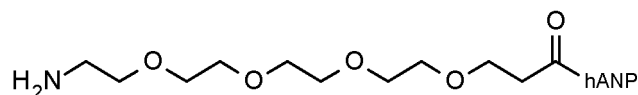


El compuesto del título SG-PEG(11)-hANP(1-28) (compuesto 2-30) (11,52 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-14B) usando el GlcNAc-PEG(11)-hANP(1-28) (15,0 mg) producido en (2-30A).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{240}H_{394}N_{52}O_{115}S_3$: $[M+5H]^{5+}$ 1189,8 (prom.), Encontrado 1189,3.

10 **<Ejemplo 2-31>** Síntesis de SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-31)(2-31A) Síntesis de H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 166]

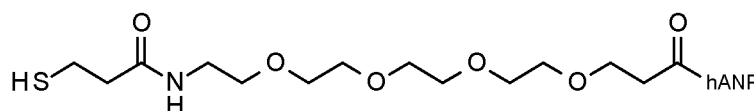


Boc-PEG(3)-hANP(1-28) (12,7 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando ácido 3-[2-[2-[2-[2-(terc-butoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propiónico (11,7 mg) y la sal de TFA de hANP(1-28) preparada a partir del acetato de hANP(1-28) (41,0 mg) mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A).

15 El compuesto del título H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (12,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) usando el Boc-PEG(3)-hANP(1-28) obtenido (12,7 mg). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{138}H_{224}N_{46}O_{44}S_3$: $[M+H]^+$ 3326,6, Encontrado 3326,6

(2-31B) Síntesis de HS-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 167]

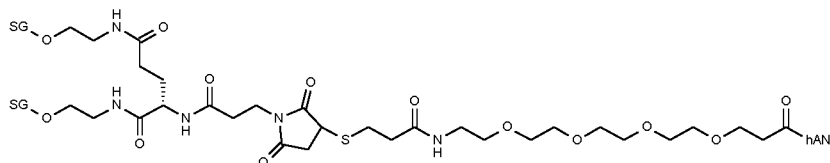


20 El compuesto del título HS-PEG(3)-hANP(1-28) (5,00 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-25A) y (2-25B) usando el H₂N-PEG(3)-hANP(1-28) (12,0 mg) producido en (2-31A).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{141}H_{228}N_{46}O_{45}S_4$: $[M+H]^+$ 3414,6, Encontrado 3414,7

(2-31C) Síntesis de SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula: compuesto 3-31)

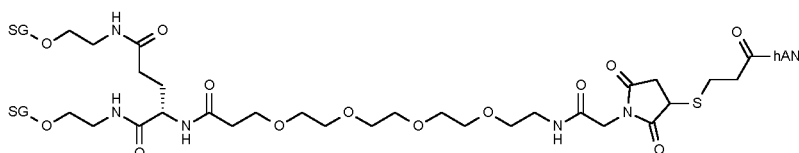
[Fórmula 168]



El compuesto del título SG-(SG-)Gln*-Mal-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-31) (2,09 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) usando el HS-PEG(3)-hANP(1-28) (4,00 mg) producido en (2-31C) y el SG-(SG-)Gln*-Mal (7,43 mg) producido en (1-15C). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{325}H_{524}N_{62}O_{174}S_4$: $[M+5H]^{5+}$ 1643,4 (prom.), Encontrado 1643,2.

- 5 **<Ejemplo 2-32>** Síntesis de SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (compuesto 2-32: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 169]

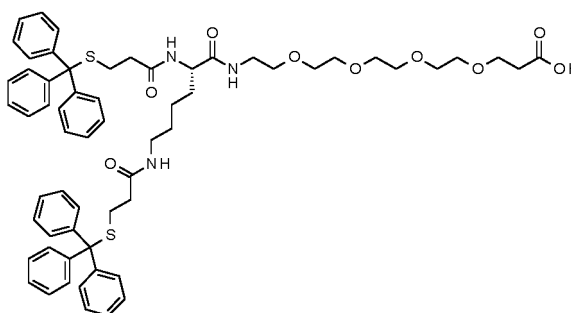


- 10 El HS-hANP(1-28) (2,3 mg) producido en (2-25B) y el SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal (4,0 mg) producido en (1-16C) se disolvieron en un disolvente mixto de un tampón acetato 0,2 M (pH 5,0) (0,10 ml) y dimetilsulfóxido (0,10 ml), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (2,0 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener el compuesto del título SG-(SG-)Gln*-PEG(3)-Mal-hANP(1-28) (compuesto 2-32) (3,5 mg). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{325}H_{528}N_{62}O_{174}S_4$: $[M+4H]^{4+}$ 2054,0 (prom.), Encontrado 2053,8.

- 15 **<Ejemplo 2-33>** Síntesis de SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-hANP(1-28) (compuesto 2-33)

(2-33A) Síntesis de TrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂H (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 170]

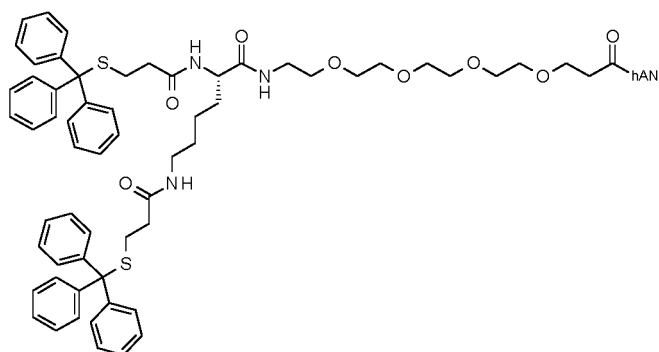


- 20 Una resina de 1,20 mmol/g de cloruro de 2-clorotritilo (83 mg, 0,100 mmol) se puso en una columna para síntesis en fase sólida. Se añadió diclorometano (2 ml) a ello, y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Después de la filtración, se añadió a ello una solución de ácido 3-[2[2[2[2-(9H-fluoren-9-
 25 ilmetoxicarbonilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propiónico (97,5 mg, 0,200 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (85,6 µl, 0,500 mmol) en diclorometano (2 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la filtración, la resina se lavó con una solución mixta de diclorometano (diclorometano:metanol:N,N-diisopropiletilamina = 85:10:5, v/v) tres veces, diclorometano tres veces, y N,N-dimetilformamida tres veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (2 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a la resina una solución de ácido (2S)-2,6-bis(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)hexanoico (177 mg, 0,300 mmol), HATU (114 mg, 0,300 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (103 µl, 0,600 mmol) en N,N-dimetilformamida (2 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-

5 dimetilformamida 4 veces. Se añadió a ello una solución al 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (2 ml), y la mezcla se agitó durante 5 minutos, seguido de filtración. Esta operación se realizó 4 veces. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces. Se añadió a ello una solución de ácido 3-tritilsulfanilpropiónico (209 mg, 0,600 mmol), HATU (228 mg, 0,600 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (205 μ l, 1,20 mmol) en N,N-dimetilformamida (2 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la filtración, la resina se lavó con N,N-dimetilformamida 4 veces y diclorometano 4 veces. Se añadió a ello una solución mixta de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (0,5 ml) y diclorometano (1,5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida. El concentrado se sometió a azeotropía con diclorometano 6 veces y se secó en una bomba de vacío para obtener el compuesto del título TrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂H en forma de un sólido de color pardo (105 mg).

(2-33B) Síntesis de TrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

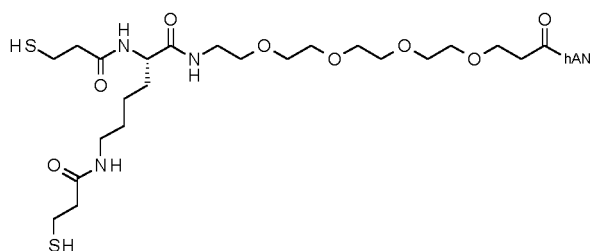
[Fórmula 171]



El compuesto del título TrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (30 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17A) a partir del TrS-(TrS-)Lys-PEG(3)-CO₂H (27,4 mg) producido en (2-33A). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₈₈H₂₇₂N₄₈O₄₇S₅: [M+H]⁺ 4114,9, Encontrado 4115,1

15 (2-33C) Síntesis de HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

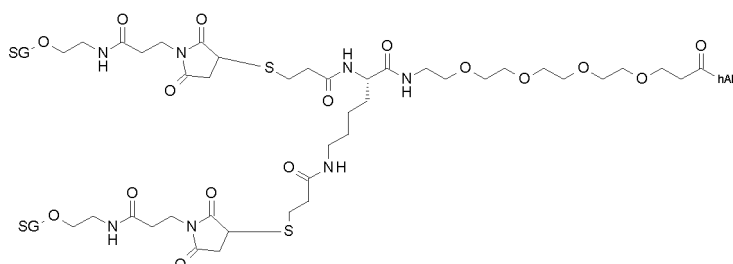
[Fórmula 172]



El compuesto del título HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (15,3 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17B) a partir del TrS-(TrS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (30,0 mg) producido en (2-33B). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₅₀H₂₄₄N₄₈O₄₇S₅: [M+H]⁺ 3630,7, Encontrado 3631,0

20 (2-33D) Síntesis de SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-33: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 173]



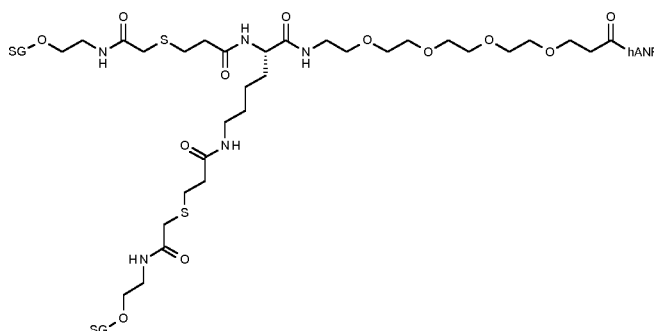
El compuesto del título SG-Mal-(SG-Mal-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-33) (8,55 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17C) a partir del HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (5,00 mg) producido mediante el enfoque de (2-33C).

5 ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{336}H_{540}N_{64}O_{177}S_5$: $[M+5H]^{5+}$ 1694,7 (prom.), Encontrado 1694,5.

<Ejemplo 2-34> Síntesis de SG-tioacetamida-(SG-tioacetamida-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-34)

(2-34A) Síntesis de SG-tioacetamida-(SG-tioacetamida-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 174]



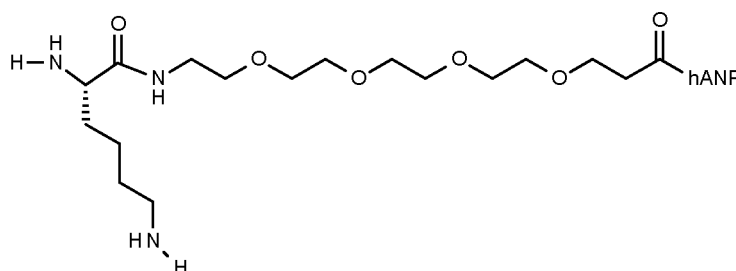
10 El compuesto del título SG-tioacetamida-(SG-tioacetamida-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-34) (4,74 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-25C) usando el HS-(HS-)Lys-PEG-(3)-hANP(1-28) (4,14 mg) producido en (2-33C) y el compuesto SG-I (7,40 mg) producido en (1-19D).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{326}H_{530}N_{62}O_{173}S_5$: $[M+5H]^{5+}$ 1650,3 (prom.), Encontrado 1650,2.

<Ejemplo 2-35> Síntesis de SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-35)

(2-35A) Síntesis de Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 175]



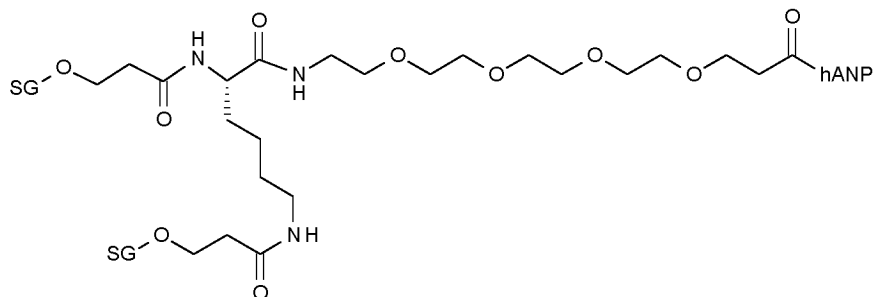
15 A una solución del compuesto 1-20A (4,40 mg, 7,42 μ mol) y HATU (2,6 mg, 6,84 μ mol) en N,N-dimetilformamida (94 μ l), se añadió N,N-diisopropiletilamina (5,0 μ l, 29,4 μ mol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos. La solución de reacción obtenida se añadió a una solución mixta de la sal de TFA de hANP(1-28) (25 mg) y N,N-diisopropiletilamina (13 μ l, 76,4 μ mol) en N,N-dimetilformamida/agua (5:1, v/v) (0,60 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió una solución acuosa al 0,2 % de ácido trifluoroacético (3 ml) a la solución de reacción, y el producto resultante se separó y se purificó por HPLC en fase inversa (GL Sciences Inc., Inertsil ODS-3) usando una solución acuosa al 0,1 % de ácido trifluoroacético y una solución al 0,1 % de ácido trifluoroacético en acetonitrilo como eluyentes y se liofilizó para obtener Boc-(Boc-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (18,0 mg).

25 El compuesto del título Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (12,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) usando el Boc-(Boc-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) obtenido (18,0 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{144}H_{237}N_{48}O_{45}S_3$: $[M+H]^+$ 3454,7, Encontrado 3454,7.

(2-35C) Síntesis de SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-35: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 176]

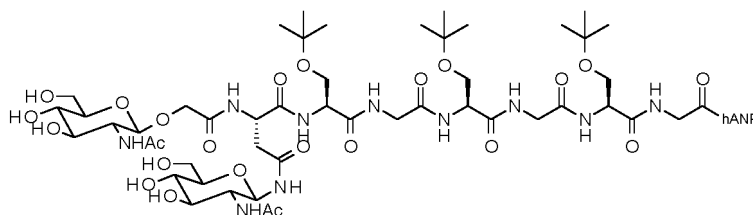


El compuesto del título SG-(SG-)Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (compuesto 2-35) (6,4 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando el Lys-PEG(3)-hANP(1-28) (6,0 mg) producido en (2-35B). ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{316}H_{507}N_{60}O_{171}S_3$: $[M-5H]^{5-}$ 1595,7 (prom.), Encontrado 1595,6.

5 <Ejemplo 2-36> Síntesis de SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (compuesto 2-36)

(2-36A) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 177]

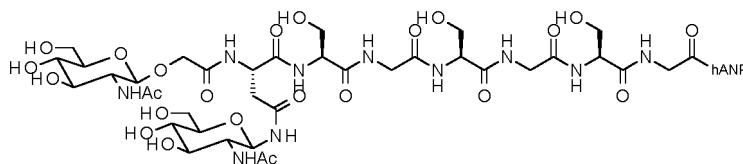


El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (27,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando el compuesto 1-21B (13,8 mg) y la sal de TFA de hANP(1-28) preparada a partir del acetato de hANP (37,1 mg) mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{176}H_{286}N_{56}O_{61}S_3$: $[M+H]^+$ 4258,0, Encontrado 4257,8

10

(2-36B) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

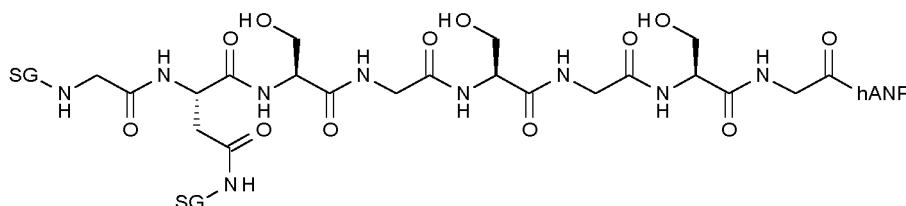
[Fórmula 178]



El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (4,66 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-17A) a partir del GlcNAc-(GlcNAc-Asn)-(tBuSer-Gly)₃-hANP(1-28) (27,0 mg) producido en (2-36A). MALDI-TOF-MS: Calc. para $C_{164}H_{262}N_{56}O_{61}S_3$: $[M+H]^+$ 4089,8, Encontrado 4090,1

15 (2-36C) Síntesis de SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (compuesto 2-36: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 179]

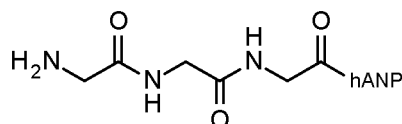


El compuesto del título SG-(SG-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (compuesto 2-36) (3,24 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) a partir del GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-(Ser-Gly)₃-hANP(1-28) (3,50 mg) producido en (2-36B). ESI-TOF-MS: Calc. para C₃₁₆H₅₀₈N₆₆O₁₇₃S₃: [M+4H]⁴⁺ 2025,0 (prom.), Encontrado 2025,0.

<Ejemplo 2-37> Síntesis de SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto 2-37)

5 (2-37A) Síntesis de Gly₃-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 180]

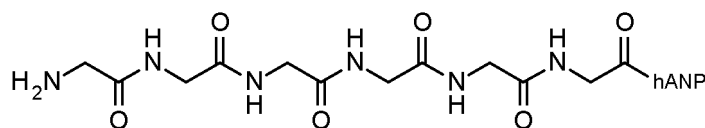


10 Boc-Gly₃-hANP(1-28) (196 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando ácido 2-[[2-[[2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil]amino]acetil]amino]acético (27,7 mg) y la sal de TFA de hANP preparada a partir de acetato de hANP (246 mg) mediante el Procedimiento de preparación 2 de (2-1A). El compuesto del título Gly₃-hANP(1-28) (190 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) a partir del Boc-Gly₃-hANP(1-28) obtenido (196 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₃₃H₂₁₂N₄₈O₄₂S₃: [M+H]⁺ 3250,5, Encontrado 3250,6

(2-37B) Síntesis de Gly₆-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 181]



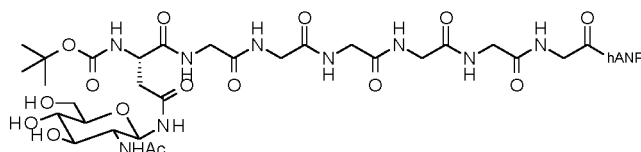
15 Boc-Gly₆-hANP(1-28) (115 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) a partir del Gly₃-hANP(1-28) (190 mg) producido en (2-37A) y ácido 2-[[2-[[2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil]amino]acetil]amino]acético (13,4 mg).

El compuesto del título Gly₆-hANP(1-28) (115 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2C) a partir del Boc-Gly₆-hANP(1-28) obtenido (115 mg).

MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₃₉H₂₂₁N₅₁O₄₅S₃: [M+H]⁺ 3421,6, Encontrado 3421,5

(2-37C) Síntesis de Boc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 182]

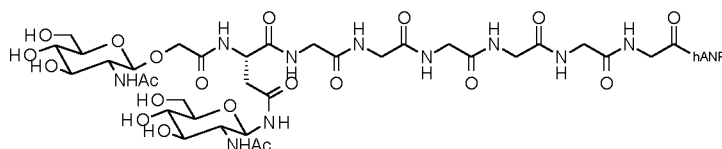


20 El compuesto del título Boc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (23,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-5A) a partir del Gly₆-hANP(1-28) (60,0 mg) producido en (2-37B).

MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₅₆H₂₄₈N₅₄O₅₄S₃: [M+H]⁺ 3838,7, Encontrado 3839,0

(2-37D) Síntesis de GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto de la siguiente fórmula)

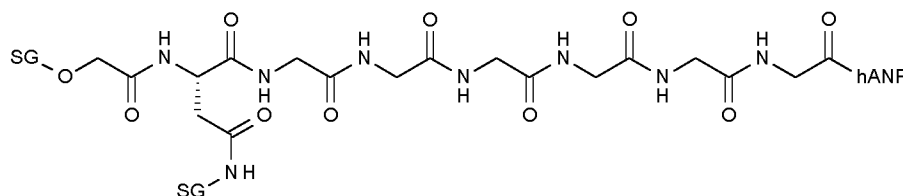
[Fórmula 183]



El compuesto del título GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (6,77 mg) de acuerdo con el mismo enfoque que en (1-5B) a partir del Boc-(GlcNAc-Asn)-Gly₆-hANP(1-28) (23,0 mg) producido en (2-37C). MALDI-TOF-MS: Calc. para C₁₆₁H₂₅₅N₅₅O₅₉S₃: [M+H]⁺ 3999,8, Encontrado 4000,1

(2-37E) Síntesis de SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto 2-37: compuesto de la siguiente fórmula)

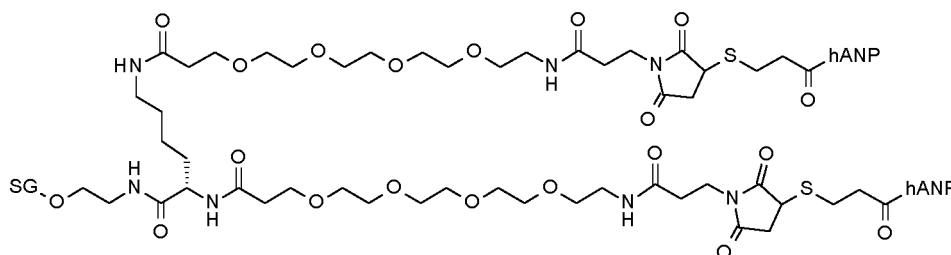
[Fórmula 184]



- 5 El compuesto del título SG-(SG-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (compuesto 2-37) (4,32 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-2D) a partir del GlcNAc-(GlcNAc-)Asn-Gly₆-hANP(1-28) (3,40 mg) producido en (2-37D). ESI-TOF-MS: Calc. para C₃₁₃H₅₀₁N₆₅O₁₇₁S₃: [M+4H]⁴⁺ 2002,7 (prom.), Encontrado 2002,5.

<Ejemplo 2-38> Síntesis de SG-Lys*-[PEG(3)-Mal-hANP(1-28)]₂ (compuesto 2-38: compuesto de la siguiente fórmula)

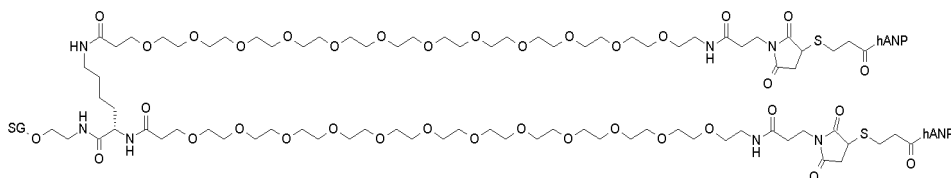
[Fórmula 185]



- 10 El compuesto del título SG-Lys*-[PEG(3)-Mal-hANP(1-28)]₂ (compuesto 2-38) (7,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-32A) usando el SG-Lys-[PEG(3)-Mal]₂ (3,0 mg, 0,94 μmol) producido en (1-22B). ESI-TOF-MS: Calc. para C₃₈₈H₆₁₆N₁₀₃O₁₅₉S₈: [M-5H]⁵⁻ 1904,8 (prom.), Encontrado 1904,8.

<Ejemplo 2-39> Síntesis de SG-Lys*-[PEG(11)-Mal-hANP(1-28)]₂ (compuesto 2-39: compuesto de la siguiente fórmula)

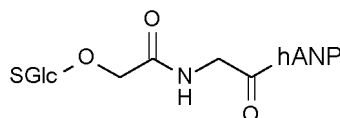
[Fórmula 186]



- 15 El compuesto del título SG-Lys*-[PEG(11)-Mal-hANP(1-28)]₂ (compuesto 2-39) (7,0 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo procedimiento que en (2-32A) usando el SG-Lys*-[PEG(11)-Mal]₂ (3,7 mg, 0,95 μmol) producido en (1-23B). ESI-TOF-MS: Calc. para C₄₂₀H₆₈₀N₁₀₃O₁₇₅S₈: [M-5H]⁵⁻ 2045,8 (prom.), Encontrado 2045,8.

<Ejemplo 2-40> Síntesis de SG(Glc)-Gly-A-hANP(1-28) (compuesto 2-40: compuesto de la siguiente fórmula)

[Fórmula 187]



El compuesto del título SG(Glc)-Gly-A-hANP(1-28) (compuesto 2-40) (34,2 mg) se obtuvo de acuerdo con el mismo enfoque que en (2-1B) usando el SG(Glc)-Gly-A (30 mg) sintetizado en (1-24E).

ESI-TOF-MS: Calc. para $C_{213}H_{341}N_{51}O_{103}S_3$: $[M+4H]^{4+}$ 1341,1 (prom.), Encontrado 1341,0

- 5 Además, se puede producir de forma apropiada hANP modificado que contiene una cadena glucídica alterada en el extremo reductor como cadena glucídica mediante el uso de diversas cadenas glucídicas alteradas en el extremo reductor sintetizadas de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 1-11, 1-12, 1-13, o 1-14 y el Ejemplo 1-24 en la producción de cada hANP modificado del Ejemplo 2.

[Ejemplos de Ensayo]

<Ejemplo de Ensayo 1> Ensayo de la actividad de elevación de GMPc del péptido modificado con glúcidos

- 10 La actividad de elevación de GMPc de cada péptido modificado preparado en el Ejemplo 2 se midió mediante el siguiente procedimiento:

se suspendieron células de CHO/GC-A humano, que son células de CHO que expresan constitutivamente GC-A humano, a 2×10^5 células/ml en α -MEM, 10 % de FBS, y 1 % de penicilina-estreptomina, se inocularon a 20 μ l/pocillo (4×10^3 células/pocillo) en una placa de 384 pocillos (Corning, 3826), y se cultivaron durante una noche en una incubadora de CO_2 . Al día siguiente, el medio se retiró de esta placa, y después, se añadió a ello tampón IBMX/KRB 1,6 mM a 10 μ l/pocillo. La mezcla se agitó en un agitador de placas y a continuación se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadió a ello a 5 μ l/pocillo una sustancia de ensayo (cada péptido modificado y hANP(1-28) nativo (Peptide Institute, Inc.); se preparó una serie de diluciones de un modo tal que el intervalo de concentración final implicó 0,01, 0,1, 1, 10, y 100 nM) preparada a una concentración 3 veces la concentración final por disolución en agua. La mezcla se agitó en un agitador de placas y después se incubó durante 15 minutos en una incubadora de CO_2 . A continuación, se añadió a ello tampón de lisis (tampón fosfato 50 mM, pH 7,0, y 1 % de Triton X-100) a 5 μ l/pocillo. Las células se lisaron por agitación durante 10 minutos en un agitador de placas. Posteriormente, se midieron los niveles de GMPc en los lisados celulares mediante el uso de un kit de GMPc (fabricado por Cisbio Bioassays). Específicamente, a una placa de 384 pocillos (Greiner, 784076), se añadieron 5 μ l/pocillo de un diluyente adjunto al kit, 5 μ l/pocillo de lisado celular, 5 μ l/pocillo de cGMP-d2, y 5 μ l/pocillo de anti GMPc-criptato. La mezcla se agitó en un agitador de placas y después se incubó durante una noche a 4 °C en oscuridad, seguido de la medición de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo usando RubyStar (fabricado por BMG LABTECH JAPAN Ltd.). El valor de actividad (T/C) de la sustancia de ensayo para cada concentración se calculó cuando el valor de actividad de un pocillo complementado únicamente con un disolvente se definió como 0 y el valor de actividad de un pocillo complementado con ANP 1 nM se definió como 1. Se representó T/C para cada concentración, y se determinó el valor máximo de T/C en el intervalo de concentración de la medición como E_{max} a partir de la curva sigmoidea obtenida con el valor de T/C = 0,5 definido como CE_{50} (Tabla 1).

- 35 A partir de los resultados de la Tabla 1, se mostró que todos los péptidos modificados exhibieron un 50 % o más de actividad de elevación de GMPc en comparación con hANP ($E_{max} > 0,5$) y mantuvieron la actividad de elevación de GMPc. Los compuestos 2-17, 2-18, y 2-20 tendieron a tener E_{max} baja del orden de 0,6 a 0,7, mientras que los demás péptidos modificados tuvieron E_{max} de 0,95 o superior y mantuvieron el efecto de elevación de GMPc equivalente al del hANP nativo.

Actividad de elevación de GMPc de compuesto de ensayo

- 40 [Tabla 1]

N.º de compuesto de la sustancia de ensayo	CE50 (nM)	Emax	N.º de compuesto de la sustancia de ensayo	CE50 (nM)	Emax
hANP nativo	0,022		2-21	0,097	1,02
2-1	0,04	1,02	2-22	0,08	1,02
2-2	0,1	1,01	2-23	2,4	0,98
2-3	0,12	1,02	2-24	0,54	1,01
2-4	0,08	1,04	2-25	0,054	1,02
2-5	0,082	1,04	2-26	0,024	1,01
2-6	1,7	1,00	2-27	0,26	1,02
2-7	1,7	0,99	2-28	0,31	1,01

2-8	0,2	1,01	2-29	0,1	1,01
2-9	1,1	1,00	2-30	0,12	1,01
2-10	0,03	1,02	2-31	0,31	1,00
2-11	0,048	1,01	2-32	0,41	1,00
2-12	0,69	1,01	2-33	0,4	1,01
2-13	0,34	1,01	2-34	0,53	1,01
2-14	0,6	0,95	2-35	0,31	1,00
2-15	3,1	0,98	2-36	0,39	1,00
2-16	0,98	1,01	2-37	0,4	1,00
2-17	35	0,70	2-38	0,016	1,01
2-18	48	0,63	2-39	0,0077	1,00
2-19	9,8	0,90	2-40	0,05	1,03
2-20	64	0,59			

<Ejemplo de Ensayo 2> Ensayo de degradación con NEP del péptido modificado

La resistencia de cada péptido modificado preparado en el Ejemplo 2 a la degradación mediante endopeptidasa neutra (nombre genérico: neprilisina) se examinó mediante el siguiente procedimiento:

- 5 Se añadió neprilisina (R&D systems, Inc.) a 1 µg/ml a una solución de una sustancia de ensayo (cada ANP modificado con glúcidos y hANP(1-28) nativo), seguido de pretratamiento a 37 °C durante 30 minutos. La solución tratada con neprilisina se usó para examinar la actividad de elevación de GMPc de la sustancia de ensayo mediante el procedimiento del Ejemplo de Ensayo 1.

10 Como resultado, el hANP nativo perdió su actividad mediante el tratamiento con NEP, mientras que el péptido modificado de la presente invención mantuvo la actividad de elevación de GMPc al mismo nivel que en el Ejemplo de Ensayo 1 incluso después del tratamiento con NEP, lo que demuestra que el péptido modificado no es susceptible a la degradación mediante NEP.

15 El mecanismo principal que subyace a la rápida desaparición del ANP de origen natural de la sangre de los animales se considera que es la degradación mediante NEP. El péptido modificado de la presente invención mantuvo la actividad de elevación de GMPc incluso después del tratamiento con NEP, lo que demuestra que el péptido modificado no es susceptible a la degradación mediante NEP incluso en los cuerpos de los animales y, cuando se administra en una cantidad eficaz, puede ejercer la actividad de elevación de GMPc durante un tiempo prolongado después de la administración.

<Ejemplo de Ensayo 3> Ensayo del tiempo de duración del péptido modificado en sangre de rata

20 El tiempo de duración (el efecto de elevar persistentemente GMPc en sangre y el tiempo durante el que fue detectable una sustancia de ensayo en sangre) de cada péptido modificado preparado en el Ejemplo 2 en la sangre de ratas se examinó mediante el siguiente procedimiento:

(1) Preparación de muestra de plasma

- 25 Isoflurano: Isoflurano de la farmacopea Japonesa Aguja y jeringa para la recogida de sangre: Jeringa Terumo 25G x 1 SR para Tuberculina
 Tubo para la recogida de sangre: Tubo de Micro recogida CAPIJECT con EDTA-2Na de 500 µl
 Tubo para el almacenamiento de sangre: Tubo de Seguimiento de Muestra MTARIX 4170 de 0,75 ml

30 Cada rata macho Slc:SD de 8 semanas de edad se sometió a anestesia por inhalación de isoflurano ((inhalación de un anestésico de inhalación Escain mantenido una concentración de un 1 a un 2 %). Una solución de una sustancia de ensayo (cada péptido modificado y hANP(1-28) nativo (Peptide Institute, Inc.)) preparada a una concentración de 100 µM por disolución en agua se inyectó rápidamente por vía intravenosa a una dosis de 100 nmol/kg (1 ml/kg) en la vena yugular de la rata. Antes de la administración y 15, 30, 60, 90, 120, 180, y 240 minutos después de la administración, se tomó una muestra de sangre (200 µl/muestra) a lo largo del tiempo de la vena yugular. Las muestras de sangre se dejaron inmediatamente en hielo.

35 Las muestras de sangre recogidas se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C durante 5 minutos mediante el uso de una centrífuga (Sigma 4K15, rotor: Nr12130-H). Las muestras de plasma separadas se dividieron en dos tipos (muestras para la medición de PK y para la medición de GMPc) y se almacenaron a -80 °C hasta la medición.

(2) Medición de la concentración de GMPc en plasma

40 La concentración de GMPc en plasma se midió usando el Sistema de Inmunoensayo Enzimático de GMPc de Amersham Biotrak(TM) (EIA) (intervalo doble) de acuerdo con el protocolo adjunto al mismo. Los resultados se representaron con la concentración de GMPc en el eje de ordenadas frente al tiempo transcurrido (min) después de la administración en el eje de abscisas para calcular AUC de 0 minutos a 240 minutos (AUC0-240) y AUC de 60 a 240 minutos después de la administración (AUC60-240) (Tabla 2).

(3) Detección de la sustancia de ensayo en muestras de plasma

Se añadieron un patrón interno (20 µl (500 nM) de un isótopo estable de hANP) y un disolvente mixto de ácido acético (AcOH/agua destilada/DMSO = 5/3/2, v/v/v) a 50 µl de cada muestra de plasma de rata preparada en (1) y después se mezclaron con la misma. La mezcla se transfirió a un equipo Amicon Ultra-0,5 50K (Millipore Corp., MA) y se centrifugó a 14000 rpm a 15 °C durante 30 minutos. El filtrado obtenido se transfirió a un equipo Amicon Ultra-0,5 3K (Millipore Corp., MA) y se centrifugó de nuevo en las condiciones mencionadas anteriormente. La solución que permaneció en el filtro se recuperó y se transfirió a una placa de 96 pocillos de pocillo profundo. El contenido de la sustancia de ensayo se midió mediante LC-MS/MS (LC: Shimadzu LC-10ADVP (Shimadzu Corp.), MS/MS: API 4000 QTrap (AB SCIEX)) para calcular la concentración en plasma. El tiempo en que se detectó finalmente la sustancia de ensayo se muestra en la columna más a la derecha de la Tabla 2.

Evaluación del tiempo de duración en sangre de rata

[Tabla 2]

	Todos los valores integrados *	Todos los valores integrados *	Valor previo y valores superiores integrados **	
N.º de compuesto de la sustancia de ensayo	AUC [(pmol/ml)*h] 0-240	AUC [(pmol/ml)*h] 60-240	AUC [(pmol/ml)*h] 60-240	Tiempo máximo de detección después de administración (h)
hANP nativo	13,90	-33,86	0,00	0
2-1	488,98	188,59	191,43	3
2-3	340,97	116,61	136,00	2
2-10	735,39	323,59	323,59	1,5
2-11	874,06	397,08	399,13	2
2-12	581,28	193,48	198,16	1,5
2-13	268,64	72,88	75,73	3
2-14	179,61	35,76	43,03	1,5
2-15	47,20	7,14	36,06	1,5
2-16	173,71	33,08	8,66	2
2-25	524,33	205,83	207,18	2
2-26	245,50	13,72	60,43	2
2-27	208,58	30,24	41,71	2
2-29	430,38	143,46	156,49	2
2-30	365,22	136,33	138,87	4
*) Valor de AUC obtenido usando un valor previo (valor a 0 minutos) como línea base e integrando las diferencias en todos los puntos a partir de la curva de la línea base. Los puntos de la curva bajo la línea base se calcularon como valores negativos.				
**) Valor de AUC obtenido usando un valor previo (valor a 0 minutos) como línea base e integrando las diferencias solo en los puntos de la curva por encima de la línea base, a partir de la línea base. Los puntos de la curva bajo la línea base se excluyeron del cálculo.				

Aunque se observó un aumento transitorio en GMPc causado por la administración en el hANP nativo, este nivel de GMPc disminuyó 30 minutos después de la administración hasta un nivel próximo al de antes del inicio de la administración. La elevación de GMPc desapareció completamente en 60 minutos o después. Por lo tanto, el hANP nativo tuvo un valor de AUC60-240 de 0 o inferior y de ese modo se confirmó que no tiene ningún tiempo de duración en sangre. En la detección de esta sustancia de ensayo en plasma, el hANP nativo ya no se detectó más en la muestra de plasma incluso 15 minutos después de la administración.

Por el contrario, los péptidos modificados del Ejemplo 2 exhibieron un valor alto de AUC60-240. La concentración de GMPc en plasma elevada mediante la administración de estas sustancias de ensayo mantuvo un valor mayor que el de antes del inicio de la administración, incluso 60 minutos o más después de la administración (180 minutos después para los compuestos 2-1 y 2-10, 120 minutos después para los compuestos 2-12, 2-13, 2-14, y 2-16, y 60 minutos después para los compuestos 2-11, 2-15, y 2-19). Además, estas sustancias de ensayo por sí mismas aún se detectaron en la muestra de plasma 1,5 horas o más después de la administración, lo que demuestra que el péptido modificado permanece en sangre durante un tiempo prolongado sin metabolizarse *in vivo*. A partir de estos resultados, se mostró que el péptido modificado de la presente invención tiene un tiempo de duración prolongada en sangre y que mantiene la actividad de elevación de GMPc en esta duración.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichi Sankyo Company, Limited

<120> Péptido Natriurético Auricular Glucosilado que comprende agentes agonistas para péptido natriurético

<130> FP1401

<150> JP2013-010612

<151> 23-01-2013

<160> 1

5 <170> Versión 3.4 de PatentIn

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <220>

<223> Inventores: Iwamoto, Mitsuhiro; Yamaguchi, Takahiro; Mori, Yutaka; Saito, Keiji; Honda, Takeshi; Nagayama, Takahiro

<400> 1

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15

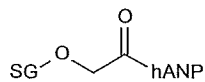
Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20 25

15

REIVINDICACIONES

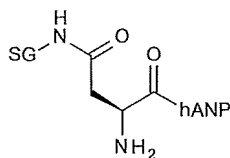
1. Péptido modificado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la fórmula de uno de los siguientes compuestos 2-1, 2-3, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14, 2-15, 2-16, 2-25, 2-26, 2-27, 2-29, o 2-30:

[Fórmula 10]



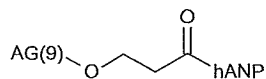
(Compuesto 2-1)

[Fórmula 11]



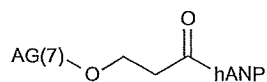
(Compuesto 2-3)

[Fórmula 12]



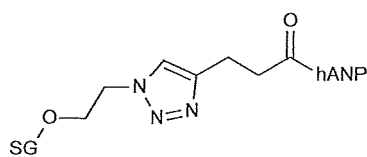
(Compuesto 2-10)

[Fórmula 13]



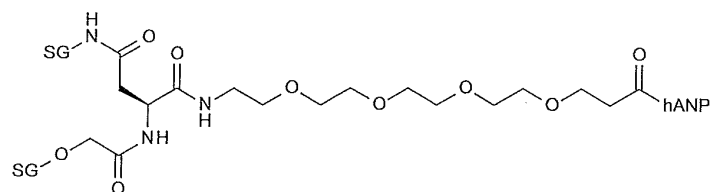
(Compuesto 2-11)

[Fórmula 14]



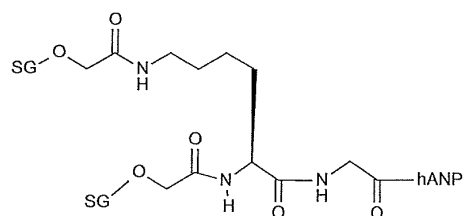
(Compuesto 2-12)

[Fórmula 15]



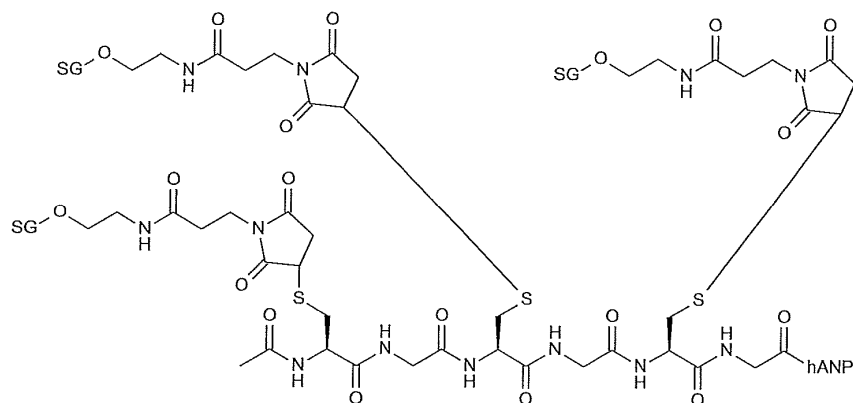
(Compuesto 2-13)

[Fórmula 16]



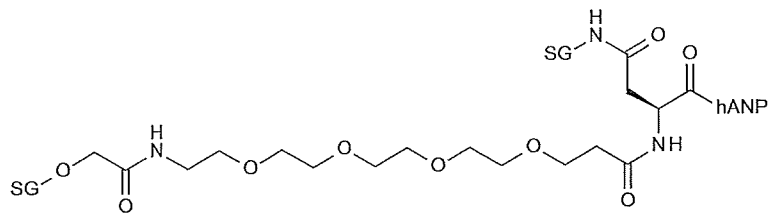
(Compuesto 2-14)

[Fórmula 17]



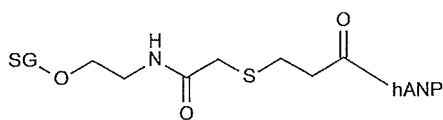
(Compuesto 2-15)

[Fórmula 18]



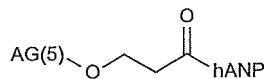
(Compuesto 2-16)

[Fórmula 19]



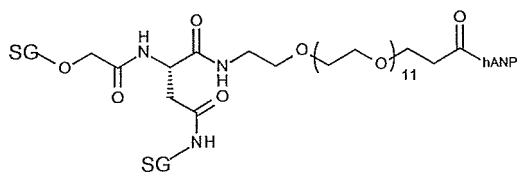
(Compuesto 2-25)

[Fórmula 20]



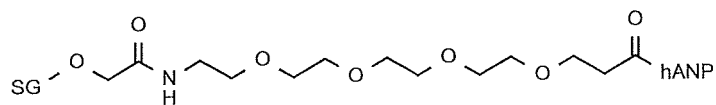
(Compuesto 2-26)

[Fórmula 21]



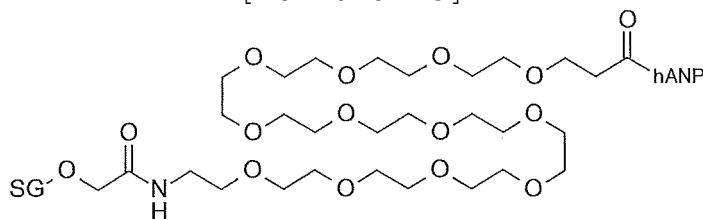
(Compuesto 2-27)

[Fórmula 22]



(Compuesto 2-29)

[Fórmula 23]

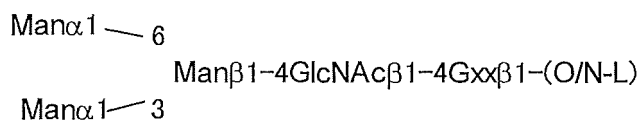


(Compuesto 2-30)

en las que hANP es hANP(1-28) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y está unido en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos a la estructura conectora a través de un enlace amida;

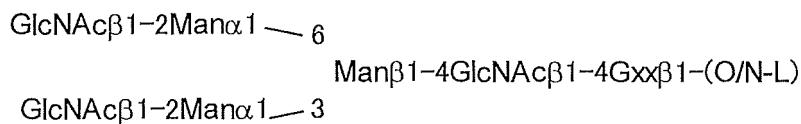
AG(5) es una sustancia de azúcar representada por la siguiente fórmula

[Fórmula 1]



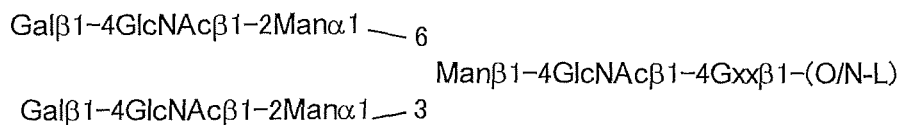
5 en la que Gxx es GlcNAc y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico; AG(7) es una sustancia de azúcar representada por la siguiente fórmula

[Fórmula 2]



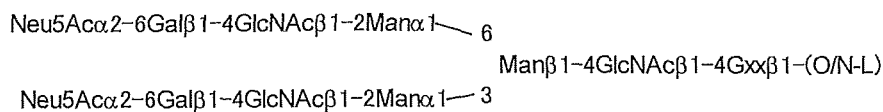
en la que Gxx es GlcNAc y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico; AG(9) es una sustancia de azúcar representada por la siguiente fórmula

[Fórmula 3]



en la que Gxx es GlcNAc y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico; y SG es una sustancia de azúcar representada por la siguiente fórmula

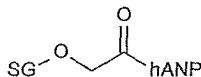
[Fórmula 4]



10 en la que Gxx es GlcNAc y "O/N-L" representa la unión a la estructura conectora a través de un enlace O-glucosídico.

2. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 10]

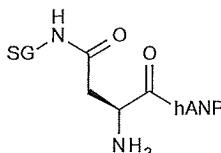


(Compuesto 2-1)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

5 3. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 11]

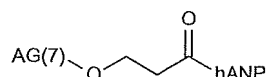


(Compuesto 2-3)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

4. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 13]

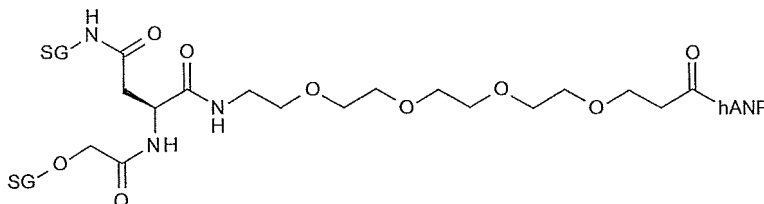


(Compuesto 2-11)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

10 5. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 15]

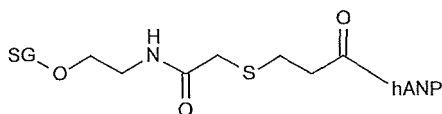


(Compuesto 2-13).

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

6. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 19]

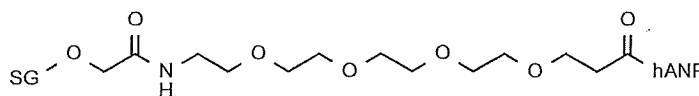


(Compuesto 2-25)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

7. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 22]

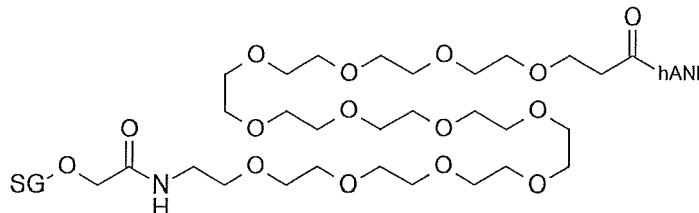


(Compuesto 2-29)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

5 8. El péptido modificado o la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido modificado tiene una estructura representada por la siguiente fórmula,

[Fórmula 23]



(Compuesto 2-30)

y, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de trifluoroacetato o una sal de acetato.

9. Medicamento que comprende un péptido modificado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10 10. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medicamento es un agente para tratar o aliviar una enfermedad cardiovascular.

11. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el medicamento es un agente para la gestión de una afección médica después del comienzo de insuficiencia cardíaca aguda.

15 12. El péptido modificado o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del alivio de una enfermedad cardiovascular.

13. El péptido modificado o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en la gestión de una afección médica después del comienzo de insuficiencia cardíaca aguda.

[Figura 1]

