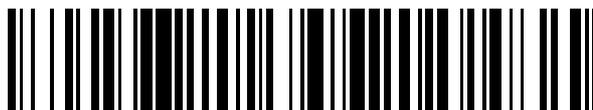


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 832**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/IB2013/050666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13111110**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13711953 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2807183**

54 Título: **Miméticos sintéticos de apelina para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591557 P

24.10.2012 US 201261717760 P

30.11.2012 US 201261731697 P

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

01.06.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GOLOSOV, ANDREI;
GROSCHKE, PHILIPP;
HU, QI-YING;
IMASE, HIDETOMO;
PARKER, DAVID, THOMAS;
YASOSHIMA, KAYO;
ZECRI, FREDERIC y
ZHAO, HONGJUAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 670 832 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

Miméticos sintéticos de apelina para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones novedosas que comprenden secuencias de péptidos y polipéptidos modificadas diseñadas para tratar enfermedades cardiovasculares en los sujetos a quienes se administren y que presentan una mayor resistencia a la degradación y una bioactividad equivalente o mayor que sus homólogos de tipo silvestre. La invención también se refiere a métodos de elaboración de dichas composiciones y al uso de estas composiciones como agentes farmacéuticamente activos para tratar enfermedades cardiovasculares.

Antecedentes de la invención

10 La incidencia de insuficiencia cardíaca en el mundo occidental es de aproximadamente 1/100 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, por lo mismo, en el gasto cardíaco, es decir, el volumen eficaz de sangre expelido por cualquiera de los ventrículos del corazón a través del tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, insuficiencia del corazón para mantener una circulación sanguínea adecuada, donde la contractilidad
15 cardíaca se deteriora adicionalmente. Existen aproximadamente 500.000 hospitalizaciones por año para "insuficiencia cardíaca descompensada aguda" (ICDA) solamente en los EE.UU.

Las terapias actuales para la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA) incluyen diuréticos, vasodilatadores y inótropos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inótropos intravenosos
20 actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) se utilizan en la situación aguda, a pesar de su asociación con eventos adversos, tales como arritmia y un aumento en la mortalidad a largo plazo. Estos inconvenientes han impedido su aplicación en la insuficiencia cardíaca crónica. La digoxina es un inótropo oral, pero está limitada por un estrecho índice terapéutico, un aumento en el potencial arritmógeno y contraindicación en la insuficiencia renal.

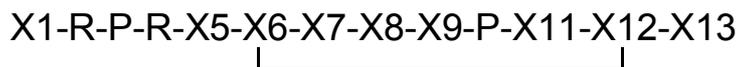
Se necesita urgentemente una terapia para la insuficiencia cardíaca que aumente la contractilidad cardíaca sin los
25 inconvenientes arritmógenos o de mortalidad para la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), pero que también pueda resolver la enorme necesidad médica insatisfecha en la insuficiencia cardíaca crónica.

La apelina es el ligando endógeno para el receptor acoplado a proteína G (RAPG) anteriormente huérfano, APJ, también denominado receptor de apelina, receptor 1 de tipo angiotensina, receptor 1 de tipo angiotensina II y similares. La vía apelina/APJ se expresa ampliamente en el sistema cardiovascular y se ha demostrado que la
30 apelina tiene efectos cardiovasculares benéficos importantes en los modelos preclínicos. La administración de apelina aguda en los seres humanos provoca vasodilatación periférica y coronaria y aumenta el gasto cardíaco (*Circulation*. 2010; 121: 1818-1827). Hamada et. al. en *Int. J. Mol. Med.*, 2008, 22, 547-552 evalúa algunos análogos cíclicos de amida de Apelina 12. Macaluso et al., en *ChemMedChem* 5, 2010, 1247-1253 explora el motivo "RPRL" de Apelina 13 a través de la estimulación molecular y la evaluación biológica de análogos cíclicos. Macaluso et al.,
35 *ChemMedChem* 6, 2011, 1017-1023 se refiere al descubrimiento de un antagonista competitivo del receptor de Apelina. Murza et al., *ChemMedChem* 7, 2012, 318-325 se refiere a la elucidación de las relaciones de estructura-actividad de la apelina e investiga la influencia de aminoácidos no naturales sobre la unión, la señalización y la estabilidad en plasma. Sidorova et al., *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2012, 38, 40-51 describe la síntesis y las propiedades cardioprotectoras de la apelina 12 y sus análogos estructurales. Como resultado, el agonismo de APJ está surgiendo
40 como un objetivo terapéutico importante para los pacientes con insuficiencia cardíaca. Se piensa que la activación del receptor de apelina APJ aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona cardioprotección, sin los inconvenientes de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas nativas presentan una vida media y una duración de acción muy cortas in vivo.

Por tanto, es deseable identificar péptidos y polipéptidos que imiten la función de la apelina, pero que tengan una
45 semivida aumentada y demuestren una bioactividad equivalente o mayor que la apelina de origen natural. Además, es deseable identificar péptidos y polipéptidos análogos de apelina que presenten restricciones conformacionales aumentadas, es decir, la capacidad para conseguir y mantener un estado conformacional activo, de manera que los péptidos y polipéptidos puedan interactuar con sus receptores y/u otros objetivos de la vía, sin necesidad de plegamiento o reposicionamiento adicionales. Existe la necesidad de usar dichos análogos de péptidos y polipéptidos, de composiciones que comprendan dichos análogos y de métodos de fabricación y uso de dichas
50 composiciones como agentes farmacéuticamente activos para tratar enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares.

Sumario de la invención

- 5 El objetivo de la presente invención es proporcionar péptidos y polipéptidos novedosos que sean útiles como agonistas de APJ y que también posean al menos una de las siguientes mejoras sobre la apelina de tipo silvestre y otros análogos de apelina conocidos: semivida aumentada; mayor inmunidad a la degradación después de su administración y/o de su solubilización; y restricciones conformacionales aumentadas, todo presentando al mismo tiempo la misma o mayor actividad biológica que la apelina de tipo silvestre. Los péptidos y polipéptidos de la presente invención son, por tanto, particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca, trastornos y afecciones asociados a la insuficiencia cardíaca y trastornos y afecciones que respondan a la activación de la actividad del receptor APJ.
- 10 En una realización, los péptidos y polipéptidos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de un trastorno o una afección asociados a la insuficiencia cardíaca, o de un trastorno que responda a la activación (o al agonismo) de la actividad del receptor APJ. En otra realización, los péptidos y polipéptidos de la invención son útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular,
- 15 la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.
- 20 La invención se refiere a los péptidos y polipéptidos, a las composiciones farmacéuticas y a los métodos de fabricación y uso de los mismos, como se describen en el presente documento. La invención proporciona un polipéptido que tiene la Fórmula II:



II

- X1 está ausente o es pE, R, Q o Isn;
- 25 X5 es L o Cha;
- X7 es H, Aib, F, K (Lauroílo) o K (Palmitoílo);
- X8 es K, F o 4-amino-Isn;
- X9 es G o Aib;
- X11 es Nle o Cha;
- 30 X13 está ausente o es F, f, K (Lauroílo), K (Palmitoílo);
- X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado entre C, c, hC, D-hC, en los que las cadenas laterales de X6 y X12 están unidas entre sí a través de un enlace covalente formando un disulfuro; y en la que el extremo N y el extremo C forman opcionalmente un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; en la que Nle es L-norleucina; D-hC es D-homocisteína; hC es L-homocisteína; Aib es el ácido α -aminoisobutírico; Cha es (S)- β -ciclohexilalanina; Isn es isonipecotinoílo; y pE es ácido L-piroglutámico.
- 35 Como se explica adicionalmente en el presente documento, se utilizan las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en la técnica para representar los restos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando esté precedido con "D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra sea una letra mayúscula, se refiere al L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra sea una letra minúscula, se refiere al D-aminoácido.
- 40 Cualquiera de los restos de aminoácidos de Fórmula II, III, IV o V, puede estar sustituido en una forma conservadora, a condición de que el péptido o polipéptido de la invención todavía conserve la actividad funcional y las propiedades estructurales (por ejemplo, extensión de la semivida, protección de la degradación, restricción conformacional). Los principios y ejemplos de las sustituciones de aminoácidos conservadoras permisibles se explican adicionalmente en el presente documento.
- 45

Los polipéptidos de la invención, mediante la activación del receptor APJ, tienen utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

En una realización preferida, los polipéptidos de la invención son útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA).

10 En otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor APJ, en un sujeto que necesite dicho tratamiento, que comprende: administrar al sujeto, una cantidad eficaz de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, de manera que se trate el trastorno o la enfermedad que responde a la activación del receptor APJ en el sujeto.

15 En otra realización más, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o sal del mismo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 En otra realización más, la invención se refiere a combinaciones que incluyen un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo y las combinaciones farmacéuticas de uno o más agentes terapéuticamente activos.

En el presente documento se describe un método para la activación del receptor APJ en un sujeto que lo necesite, que comprende: administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

Descripción detallada de la invención

25 Para los fines de interpretar la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se especifique lo contrario y siempre que sea apropiado, los términos utilizados en el singular también incluirán el plural y viceversa.

30 Como se utiliza en el presente documento, "trastornos o enfermedades que responden a la modulación del receptor APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de la actividad del receptor APJ", "trastornos que responden a la activación (o al agonismo) de la actividad del receptor APJ" y términos similares incluyen la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

40 Como se utiliza en el presente documento, "Activación de la actividad del receptor APJ", o "Activación del receptor APJ", se refiere a un aumento en la actividad del receptor APJ. La activación de la actividad del receptor APJ también se denomina "agonismo" del receptor APJ, por ejemplo, mediante la administración de los péptidos y polipéptidos de la invención.

45 Como se utilizan en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se utilizan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Excepto por las abreviaturas para los aminoácidos no comunes o no naturales establecidos en la Tabla 1 a continuación, se utilizan las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en la técnica, para representar restos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido con "D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, se refiere al D-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, se refiere al L-aminoácido. Los grupos o cadenas o abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar péptidos. Los péptidos se indican con el extremo N a la izquierda y la secuencia se escribe desde el extremo N hasta el extremo C.

Los péptidos de la invención contienen aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no son de origen natural) y de una manera alternativa, se pueden emplear otros análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica.

- Se pueden introducir ciertos aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters et al., *J Am Chem Soc* 125: 11782-11783, 2003; Wang y Schultz, *Science* 301: 964-967, 2003; Wang et al., *Science* 292: 498-500, 2001; Zhang et al., *Science* 303: 371-373, 2004, o en la Patente de los EE.UU. N.º 7.083.970. En resumen, algunos de estos sistemas de expresión implican mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón sin sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Después, dichos vectores de expresión se introducen en un hospedador que pueda utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y se cargan con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales particulares que son beneficiosos con el fin de conjugar los restos con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido.
- Uno o más de los aminoácidos naturales o no naturales en un péptido de la invención se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química, tal como un grupo hidrato de carbono, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso ($C_qH_{2q+1}C(O)_2H$ en el que q es de 3 a 20), un enlazador para conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. Dichas modificaciones se pueden hacer de una manera específica del sitio o no específica del sitio. En una realización preferida, las modificaciones del péptido conducen a un péptido más estable (por ejemplo, uno que presenta una mayor semivida in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la incorporación de los D-aminoácidos adicionales, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido, pero dichas modificaciones pueden conferir propiedades deseables, por ejemplo, una mejor actividad biológica, al péptido.
- Dichas modificaciones potencian las propiedades biológicas de las proteínas de la invención en relación con las proteínas de tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de unión para, por ejemplo, marcadores y agentes de prolongación de la semivida de la proteína y para los fines de fijar estas variantes a la superficie de un soporte sólido.
- En ciertas realizaciones, dichas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas de sitio, se utilizan para fijar conjugados, por ejemplo, grupos PEG a los polipéptidos y/o péptidos de la invención, para los fines, por ejemplo, de prolongar la semivida o de mejorar de otra manera las propiedades biológicas de dichos polipéptidos y/o péptidos. Dichas técnicas se describen adicionalmente en el presente documento.
- En otras realizaciones, dichas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan para fijar otros polímeros y moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que prolongan la semivida del polipéptido de la invención. Una realización de este tipo incluye la fijación de ácidos grasos o compuestos de unión a albúmina específicos para los polipéptidos y/o péptidos. En otras realizaciones, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular y se pueden fijar en uno o más sitios sobre los polipéptidos.
- En otras realizaciones, dichas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan como un medio de fijación para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetrámeros. Estas moléculas de proteína multiméricas adicionalmente pueden tener fijados grupos, tales como PEG, azúcares, y/o conjugados de PEG-colesterol, o pueden condensarse ya sea amino-terminalmente o carboxi-terminalmente con otras proteínas, tales como Fc, albúmina de suero humano (HSA), etc.
- En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas del sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos, en donde la posición de la pirrolisina o del análogo de pirrolisina incorporado específicamente en el sitio, o los aminoácidos que no se presentan naturalmente (para-acetil-Phe, para-azido-Phe), permite tener una orientación y unión controlada de dichas proteínas, polipéptidos y/o péptidos sobre una superficie de un soporte sólido, o permite tener grupos, tales como PEG, azúcares y/o conjugados de PEG-colesterol fijados.
- En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio, las proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando de esta manera hetero-oligómeros, incluyendo, pero sin limitación, heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio las proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando de esta manera conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido, conjugados de polipéptido-polipéptido, conjugados de polipéptido-péptido o conjugados de péptido-péptido. En otras realizaciones, una modificación específica del sitio puede incluir un punto de ramificación para permitir que se una más de un tipo de molécula en un solo sitio de una proteína, polipéptido o péptido.
- En otras realizaciones, las modificaciones enumeradas en el presente documento se pueden hacer de una manera no específica del sitio y pueden proporcionar como resultado conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido, conjugados de polipéptido-polipéptido, conjugados de polipéptido-péptido o conjugados de péptido-péptido de la invención.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona complejos que comprenden al menos un péptido o polipéptido de una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V enlazado a un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se enlace específicamente a un péptido o polipéptido como se desvela en el presente documento.

5 Un experto habitual en la materia apreciará que se pueden hacer diversas sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras, en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, sin disminuir necesariamente su actividad. Como se utiliza en el presente documento, "aminoácido habitualmente utilizado como un sustituto del mismo" incluye las sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). Para los fines de la sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, 10 fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares (hidrófilos) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los ejemplos de las sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente, la sustitución de cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tengan una cadena lateral que contenga tiol, la sustitución de una lisina por homolisina, ácido diamino-butírico, ácido diamino-propiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tengan una cadena lateral que contenga amino, o la 15 sustitución de una alanina por norvalina, o similares.

El término "aminoácido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los aminoácidos de origen natural, a los aminoácidos no naturales, a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que actúan de una 20 manera similar a los aminoácidos de origen natural, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite dichas formas estereoisoméricas. Los aminoácidos se denominan en el presente documento ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

La expresión "de origen natural" se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. De una manera similar, "de origen no natural", "no natural" y similares, como se utilizan en el presente documento, se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado o sintetizado estructuralmente por el hombre. Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, la expresión "de origen natural" se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A o Ala), cisteína (C o Cys), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), fenilalanina (F o Phe), glicina (G o Gly), histidina (H o His), isoleucina (I o Ile), lisina (K o Lys), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), asparagina (N o Asn), prolina (P o Pro), glutamina (Q o Gln), arginina (R o Arg), serina (S o Ser), treonina (T o Thr), valina (V o Val), triptófano (W o Trp) y tirosina (Y o Tyr)). 30

Las expresiones "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se utilizan en el presente documento, pretenden representar de una manera intercambiable las estructuras de aminoácidos que no pueden generarse biosintéticamente en cualquier organismo utilizando genes no modificados o modificados a partir de cualquier organismo, ya sean iguales o diferentes. Las expresiones se refieren a un resto de aminoácido que no está presente en la secuencia de la proteína apelina (de tipo silvestre) de origen natural, o en las secuencias de la presente invención. Éstas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos y/o análogos de aminoácidos modificados que no son uno de los 20 aminoácidos de origen natural, selenocisteína, pirrolisina (Pyl), o pirrolina-carboxi-lisina (Pcl, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente según el TCP WO2010/48582). Dichos restos de 40 aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante la sustitución de los aminoácidos de origen natural, y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de la proteína apelina (de tipo silvestre) de origen natural, o en las secuencias de la invención. El resto de aminoácido no natural también se puede incorporar de manera que se imparta una funcionalidad deseada a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad para unirse a un resto funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el símbolo "U" 45 significará "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se utilizan en el presente documento.

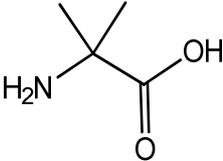
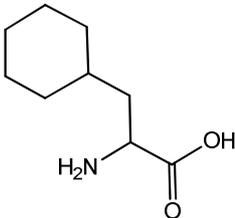
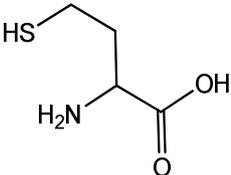
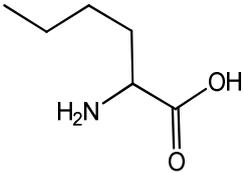
Además, se entiende que dichos "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt (RS) modificada para su incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" se generan mediante un proceso de selección como se desarrolla por Schultz et al., o mediante mutación aleatoria o dirigida. A manera de ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un "aminoácido natural" debido a que se genera biosintéticamente mediante genes transferidos desde un organismo hacia dentro de las células hospedadoras y debido a que se incorpora en las proteínas utilizando los genes de ARNt y de sintetasa de ARNt naturales, mientras que la p-amino-fenilalanina (véase, *Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code*, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. *J Am Chem Soc.* 29 de enero de 2003; 125(4): 935-9) es un "aminoácido innatural" debido a que, aunque se genera biosintéticamente, se incorpora 55 en las proteínas mediante un par ARNt/sintetasa de ARNt ortogonal "seleccionado".

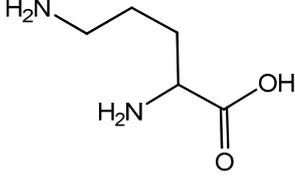
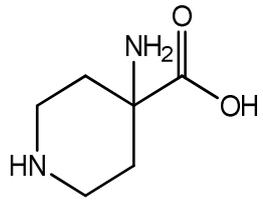
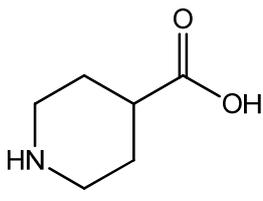
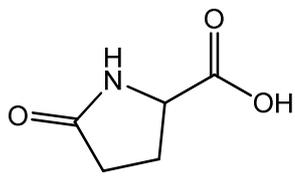
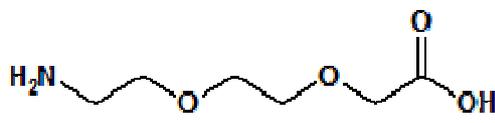
Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxil-prolina, γ -carboxi-glutamato, O-fosfoserina, ácido azetidín-carboxílico, ácido 2-amino-adípico, ácido 3-amino-adípico, beta-alanina, ácido amino-propiónico, ácido 2-amino-butírico, ácido 4-amino-butírico, ácido 6-amino-caproico, ácido 2-amino-heptanoico, ácido 2-amino-isobutírico, ácido 3-amino-isobutírico, ácido 2-amino-pimélico, terbutil-glicina, ácido 2,4-diamino-isobutírico,

5 desmosina, ácido 2,2'-diamino-pimélico, ácido 2,3-diamino-propiónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etil-asparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi-prolina, 4-hidroxi-prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metil-alanina, N-metilglicina, N-metil-isoleucina, N-metil-pentil-glicina, N-metil-valina, naftilalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentil-glicina, ácido piperídico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye los aminoácidos de origen natural que son metabolitos en ciertos organismos, pero que no son codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Dichos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

10 La expresión "análogo de aminoácido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, a manera de ejemplo solamente, un carbono α que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Los análogos de aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que son químicamente bloqueados, de una manera reversible o irreversible, o que se modifican químicamente su grupo carboxilo C-terminal, su grupo amino N-terminal, y/o sus grupos funcionales de cadena lateral. Estos análogos incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de metionina, metionina-sulfona, S-(carboximetil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína, S-(carboximetil)-cisteína-sulfona, (beta-metil-éster) de ácido aspártico, N-etilglicina, alanina carboxamida, homoserina, norleucina y metionina metil sulfonio.

Tabla 1: Aminoácidos innaturales o no naturales como se describen en la invención:

Símbolo	Nombre	Estructura
Aib	Ácido α -amino-isobutírico	
Cha	β -Ciclohexilalanina	
hC	Homocisteína	
Nle	Norleucina	

Símbolo	Nombre	Estructura
Orn	Ornitina	
4-amino-Isn	Ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico (el grupo 4-amino forma el enlace peptídico)	
Isn	Ácido Isonipecotinoico	
pE	Ácido piroglutámico	
O2Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico	

Como se utiliza en el presente documento, el término “amida” se refiere a un derivado de amida del grupo de ácido carboxílico en el extremo C (por ejemplo, -C(O)NH₂, -C(O)NH-alquilo C₁₋₆, -C(O)NH-alquilo C₁₋₂-fenilo, -C(O)NH-NHBn o -C(O)N(alquilo C₁₋₆)₂).

5 El término “amida” también se refiere a un derivado del grupo amino en el extremo N (por ejemplo, -NHC(O)-alquilo de 1 a 16 átomos de carbono, -NHC(O)(CH₂)_nPh (n es un entero de 1 a 6), -NHC(O)(CH₂)₂CO₂H, 4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)NH-, C₁₁H₂₃C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-NH-, C₁₃H₂₇C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-NH-; C₁₅H₂₇C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)NH-, Ph-CH₂CH₂NHC(O)-NH- o CH₃(OCH₂CH₂)_mC(O)NH- (m es un entero de 1 a 12).

10 Como se utiliza en el presente documento, el término “éster” se refiere a una forma de un derivado de éster del grupo de ácido carboxílico en el extremo C (por ejemplo, -COOR), en el que R del éster se refiere a grupos alquilo

5 C₁₋₆, tales como metilo, etilo, propilo normal, isopropilo, butilo normal, etc., grupos cicloalquilo C₃₋₈, tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos arilo C₆₋₁₀, tales como fenilo, α-naftilo, etc., grupos aril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₆, por ejemplo, los grupos fenil-alquilo C₁₋₂ tales como bencilo, fenetilo, benzhidrilo, etc. y grupos α-naftil-alquilo C₁₋₂, tales como α-naftilmetilo y similares. También se puede hacer mención del pivaloiloximetil éster y similares, que son habitualmente utilizados como ésteres para su administración oral. Cuando los polipéptidos de la invención poseen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en posiciones diferentes del extremo C, esos polipéptidos, en donde estos grupos están amidados o esterificados, también caen bajo la categoría del polipéptido de la invención. En dichos casos, los ésteres, por ejemplo, pueden ser las mismas clases de ésteres que los ésteres C-terminales mencionados anteriormente.

10 El término "APJ" (también denominado "receptor de apelina", "receptor 1 tipo angiotensina", "receptor 1 tipo angiotensina II" y similares), indica un resto 380, un dominio transmembrana 7, un receptor acoplado a *Gi* cuyo gen se localiza sobre el brazo largo del cromosoma 11 en los seres humanos (NCBI secuencia de referencia: NP_005152.1 y codificada por NCBI secuencia de referencia: NM_005161). El APJ se clonó por primera vez en
 15 *Gene*, 136: 355-60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor 1 tipo angiotensina II. A pesar de esta homología, sin embargo, la angiotensina II no se enlazan al APJ. Aunque fue huérfano durante muchos años, el ligando endógeno se aisló y se nombró como apelina (Tatemoto et al., *Biochem Biophys Res Commun* 251, 471-6 (1998)).

20 El término "apelina" indica una pre-proteína de 77 restos (NCBI secuencia de referencia: NP_0059109.3 y codificada por NCBI secuencia de referencia: NM_017413.3), que llega a procesarse en formas biológicamente activas de los péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, denominado "apelina-36", comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13-mero de apelina (apelina-13), denominada "Pyr-1-apelina-13 o Pyr1-apelina-13". Se describen diferentes formas de apelina, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.492.324B1.

25 **Polipéptidos de la invención:**

En la presente se describen diversas realizaciones de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales.

En la realización 4, la invención se refiere a un péptido o un polipéptido que tienen la Fórmula II:



X1 está ausente o es pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

X7 es H, Aib, F, K (Lauroílo) o K (palmitoílo);

X8 es K, F o 4-amino-LSN;

35 X9 es G o Aib;

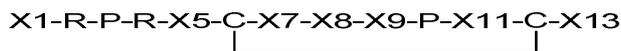
X11 es Nle o Cha;

X13 está ausente o es F, f, K (Lauroílo), K (palmitoílo);

40 X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado entre C, c, hC, D-hC, en los que las cadenas laterales de X6 y X12 de X6 y X12 están unidas entre sí a través de un enlace covalente que forma un enlace disulfuro; y

en la que el extremo N y el extremo C forman opcionalmente un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos.

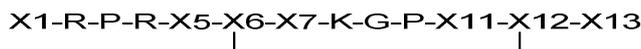
En la realización 9, ciertos polipéptidos de la invención incluyen péptidos o polipéptidos de acuerdo con la realización 4, que tienen la Fórmula III:



III;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

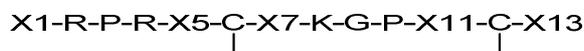
En la realización 10, ciertos péptidos y polipéptidos de la invención incluyen péptidos y polipéptidos de acuerdo con la realización 4 que tienen la Fórmula IV:



IV;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 11, ciertos polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos de acuerdo con la realización 4 o 10, que tienen la Fórmula V:



V;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

Cualquiera de los restos de aminoácidos enumerados anteriormente o a continuación de Fórmula II, III, IV o V, pueden estar sustituidos en una forma conservadora, a condición de que el péptido o polipéptido de la invención todavía conserve las propiedades de actividad funcional y estructural (por ejemplo, prolongación de la semivida, protección de la degradación, restricción conformacional). Los principios y ejemplos de las sustituciones de aminoácidos conservadoras permisibles se explican adicionalmente en el presente documento.

Las siguientes realizaciones se pueden utilizar de una manera independiente, colectiva o en cualquier combinación o sub-combinación:

En la realización 17, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V o una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X1 es pE.

En la realización 18, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X1 está ausente; o a una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En un aspecto de esta realización, el extremo N del péptido es una amida. En la realización 19, un aspecto adicional de la realización 18, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que el X1 está ausente y el extremo N es una amida de la fórmula -NHR y R es CH₃C(O)-, CH₃-(O-CH₂CH₂)m-C(O)-, Palmitoílo (O₂Oc)_p, Miristoílo (O₂Oc)_p, Lauroílo (O₂Oc)_p o Ph-CH₂CH₂NHC(O)-, Acetilo, benzoílo, fenacilo, succinilo, octanoílo, 4-fenilbutanoílo, 4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)-, o Ph-CH₂CH₂NHC(O)-; y en los que:

p es un entero de 1 a 4;

m es un entero de 1 a 12;

Lauroílo (O₂Oc)_p es C₁₁H₂₃C(O)[NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)]_p-;

Miristoílo (O₂Oc)_p es C₁₃H₂₇C(O)[NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)]_p-;

Palmitoílo (O₂Oc)_p es C₁₅H₃₁C(O)[NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)]_p-. En un aspecto particular de esta realización, R es acetilo, benzoílo, fenacilo, succinilo, octanoílo, 4-fenil-butanoílo, 4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)-, o Ph-CH₂CH₂NHC(O)-.

En la realización 20, la invención se refiere a un péptido o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que el extremo N es una amida de Fórmula NHR1, en la que R1 es CH₃C(O)-, CH₃-(O-CH₂CH₂)m-C(O)-, Palmitoílo (O₂Oc), Miristoílo (O₂Oc), Lauroílo (O₂Oc) o Ph-CH₂CH₂NHC(O)-; y en los que m, Lauroílo (O₂Oc), Miristoílo (O₂Oc) y Palmitoílo (O₂Oc) se han definido anteriormente.

En la realización 21, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X13 es F; o a una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En la realización 22, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X13 está ausente; o a una amida, un éster o una sal del polipéptido. En la realización 23, un aspecto de la realización 22, el extremo C es una amida. En la realización 24, un aspecto adicional de la realización 23, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que el extremo C es una amida de Fórmula $-C(O)R_2$ y R_2 es $-NH_2$, $-NH-Me$, $-NH-NHBn$, o $-NH-(CH_2)_2-Ph$. En un aspecto preferido de la realización 23, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que el extremo C es una amida de Fórmula $-C(O)R_2$ y R_2 es $-NH-(CH_2)_2-Ph$.

En la realización 25, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X5 es L.

En la realización 26, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X7 es H.

En la realización 27, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X8 es K o F. En un aspecto adicional de esta realización, X8 es K.

En la realización 28, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a cualquiera de cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X9 es G.

En la realización 29, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en los que X11 es Nle.

En otra realización, los polipéptidos individuales de acuerdo con la invención son aquellos enumerados en la sección de Ejemplos a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "polipéptido de la presente invención" se refiere a un polipéptido de Fórmula II, III, IV o V; o a una amida, un éster o una sal del mismo.

A menos que se especifique lo contrario, las expresiones "polipéptidos de la presente invención", "péptidos de la presente invención", "agonistas peptídicos de apelina" y similares, se refieren a los péptidos y polipéptidos de Fórmula II, III, IV o V; o a una amida, un éster o una sal de los mismos. Los péptidos y polipéptidos de la invención demuestran una actividad y/o estabilidad en plasma sustancialmente equivalente o mejorada sobre los péptidos y polipéptidos de apelina conocidos descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, apelina de tipo silvestre, apelina-13 y pyr-1-apelina-13.

Los péptidos y polipéptidos de la invención también abarcan los péptidos y polipéptidos que son al menos aproximadamente el 95 % idénticos a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas II, III, IV o V, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, así como a cualesquiera péptidos o polipéptidos específicamente enumerados en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, los ejemplos experimentales.

Como se utiliza en el presente documento, la frase "secuencia de aminoácidos homóloga", o las variaciones de la misma, se refiere a las secuencias caracterizadas por una homología, al nivel de los aminoácidos, de al menos un porcentaje especificado y se utiliza de una manera intercambiable con "identidad de secuencia". Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen las secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras y cuyos polipéptidos tienen la misma unión y/o la misma actividad. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos es homóloga si tiene al menos el 60 % o más y hasta el 99 % de identidad con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos es homóloga si comparte uno o más y hasta 60 sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos homólogas tienen no más de 5 o no más de 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La homología también puede estar al nivel del polipéptido. El grado o el porcentaje de identidad de los péptidos o polipéptidos de la invención, o de porciones de los mismos y diferentes secuencias de aminoácidos, se calcula como el número de emparejamientos exactos en una alineación de las dos secuencias, dividido entre la longitud de la

“secuencia de la invención” o de la “secuencia extraña”, cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente el 80-99,9 %, preferentemente del 90-99,9 % con la secuencia de aminoácidos descrita en los ejemplos específicos y que posee una estabilidad en plasma superior a la apelina-13 o a la pyr-1-apelina-13, pertenece a la categoría del polipéptido de la invención. En una realización, la mejora de la estabilidad en plasma es de al menos 2 veces. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 60 minutos, preferentemente de al menos 100 minutos y más preferentemente al menos 150 minutos.

La expresión "sustancialmente equivalente" significa que la naturaleza de la actividad de unión del receptor, la actividad de transducción de señales y similares, es equivalente. Por tanto, es permisible que estén presentes incluso diferencias entre los grados, tales como la fuerza de la actividad de unión del receptor y el peso molecular del polipéptido.

Un polipéptido como se describe en el presente documento, o un equivalente sustancial del mismo, mediante la sustitución, delección, adición o inserción de uno o más aminoácidos, se puede mencionar como los polipéptidos que contienen un equivalente o equivalentes sustanciales de la secuencia de aminoácidos en el sentido anterior. Un polipéptido como se describe en el presente documento, o un equivalente sustancial del mismo, mediante la sustitución de 1 a 5, preferentemente de 1 a 3 y más preferentemente 1 o 2 aminoácidos, con los aminoácidos naturales o innaturales, se puede mencionar como los polipéptidos que contienen un equivalente o equivalentes sustanciales de la secuencia de aminoácidos en el sentido anterior. Las modificaciones y alteraciones adicionales pueden incluir el reemplazo de un L-aminoácido con un D-aminoácido, u otra variación, incluyendo, pero sin limitación, fosforilación, carboxilación, alquilación y similares, siempre que se mantenga la actividad agonista de apelina del péptido o polipéptido de Fórmulas II, III, IV o V y que se mejore la estabilidad en plasma sobre la forma piroglutamada de la apelina-13. Por ejemplo, los D-aminoácidos son bien tolerados con respecto a la actividad y estabilidad del polipéptido en la posición 2 (X2), en la posición 3 (X3), en las posiciones 5, 6, 7 y 8 (X5, X6, X7 y X8), en la posición 10 (X10) y en la posición 13 (X13) de los péptidos y polipéptidos cíclicos de Fórmulas II, III, IV o V.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los polipéptidos de la presente invención y que normalmente no son biológicamente o de otra manera indeseables. En muchos casos, los polipéptidos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de los grupos amino y/o carboxilo, o de grupos similares a los mismos.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y con ácidos orgánicos, por ejemplo, las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, cloruro/clorhidrato, clorteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, lauril-sulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato ácido/fosfato diácido, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Los ácidos inorgánicos de los que pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares.

Los ácidos orgánicos de los que pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico y similares. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con bases inorgánicas y orgánicas.

Las bases inorgánicas de las que pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, las sales de amonio y de los metales a partir de las columnas I a XII de la Tabla Periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, cinc y cobre; las sales particularmente adecuadas incluyen las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Las bases orgánicas de las que pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio iónico y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto parenteal, un resto básico o ácido, mediante los métodos químicos convencionales. En general, dichas sales se

pueden preparar mediante la reacción de las formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, o bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o mediante la reacción de las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Dichas reacciones normalmente se realizan en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, es deseable el uso de medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, cuando sea practicable. Pueden encontrarse listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20a Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares y combinaciones de los mismos, como se conocerían por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Edición, Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto hasta donde cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un polipéptido de la presente invención se refiere a una cantidad del polipéptido de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la mejora de un síntoma, el alivio de una afección, ralentizar o retardar el progreso de la enfermedad, o la prevención de una enfermedad, etc. En una realización no limitante, la expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del polipéptido de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para: (1) al menos parcialmente aliviar, inhibir, impedir y/o mejorar una afección, un trastorno o una enfermedad o un síntoma de la misma (i) que mejora mediante la activación del receptor APJ, o (ii) se asocia a la actividad del receptor APJ, o (iii) caracterizada por una actividad anormal del receptor APJ; o (2) activar el receptor APJ.

En otra realización no limitante, la expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del polipéptido de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o a un tejido, o a un material biológico no celular, o a un medio, es eficaz para al menos parcialmente activar el receptor APJ. Como se apreciará por los expertos habituales en la materia, la cantidad absoluta de un agente particular que sea eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el agente que se vaya a entregar, el tejido objetivo, etc. Los expertos habituales en la materia entienden que "una cantidad terapéuticamente eficaz" se puede administrar en una sola dosis o se puede conseguir mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar la insuficiencia cardíaca, una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para proporcionar como resultado la mejora clínica del paciente, por ejemplo, una mayor tolerancia/capacidad al ejercicio, un aumento en la presión sanguínea, una disminución en la retención de fluidos, y/o mejores resultados en una prueba cuantitativa del funcionamiento cardíaco, por ejemplo, la fracción de expulsión, la capacidad de ejercicio (el tiempo hasta quedar exhausto), etc.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Normalmente, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (por ejemplo, a seres humanos), reses, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En otras realizaciones más, el sujeto es un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibir", "inhibición" o "inhibiendo" se refiere a la reducción o supresión de una afección, síntoma, o trastorno, o enfermedad dada, o a una disminución significativa en la actividad de la línea base de una actividad o proceso biológico.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar", "tratando" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno, se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o el trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluyendo los que no puedan ser discernibles por el paciente. En otra realización más, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambas. En otra realización más, "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retardar el establecimiento o desarrollo o progreso de la enfermedad o del trastorno.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia, el establecimiento, o el desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto, resultante de la administración de una terapia (por ejemplo, de un agente terapéutico), o de la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, de una combinación de agentes terapéuticos).

Como se utiliza en el presente documento, un sujeto está "en necesidad de" un tratamiento si este sujeto se beneficiaría biológicamente, médicamente, o en su calidad de vida a partir de dicho tratamiento.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "un", "uno", "el" y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (en especial en el contexto de las reivindicaciones), se debe interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en el presente documento o que sea claramente contradicho por el contexto.

10 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en el presente documento o que sea de otra manera claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o del lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tales como") proporcionado en el presente documento, pretende meramente iluminar mejor la invención y no presenta una limitación sobre el alcance de la invención reivindicada de otra manera.

15 Los péptidos y polipéptidos de la presente invención se pueden producir mediante los procedimientos conocidos por sí mismos para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de entre una síntesis en fase sólida y una síntesis en fase líquida. Por tanto, el péptido y polipéptido de interés se puede producir mediante la condensación de un péptido parcial o aminoácido capaz de constituir la proteína con la parte residual del mismo y, cuando el producto tiene un grupo protector, este grupo protector se desprende, sobre lo cual, se puede fabricar el péptido deseado. Los métodos conocidos para la condensación y la desprotección incluyen los procedimientos que se describen en la siguiente bibliografía (1) a (5):

(1) M. Bodanszky y M. A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, Nueva York, 1966,

20 (2) Schroeder y Luebke, *The Peptide*, Academic Press, Nueva York, 1965,

(3) Nobuo Izumiya et al., *Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis*, Maruzen, 1975,

(4) Haruaki Yajima y Shumpei Sakakibara, *Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV*, 205, 1977, y

(5) Haruaki Yajima (Editor), *Development of Drugs-Continued*, 14, *Peptide Synthesis*, Hirokawa Shoten.

25 Después de la reacción, el péptido se puede purificar y aislar mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos y recristalización. Cuando el péptido aislado como anteriormente es un compuesto libre se puede convertir en una sal adecuada mediante el método conocido. Por el contrario, cuando el producto aislado es una sal, se puede convertir en el péptido libre mediante el método conocido.

30 La amida del polipéptido se puede obtener mediante la utilización de una resina para la síntesis de péptidos, que es adecuada para la amidación. La resina incluye resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de 4-benciloxibencil alcohol, resina de 4-metilbenzhidril-amina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetamidometilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi, resina de cloruro de 2-clorotritilo, etcétera. Utilizando una resina de este tipo, los aminoácidos cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de cadena lateral se han protegido de una manera adecuada y se condensan sobre la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo mediante diversas técnicas de condensación que son conocidas por sí mismas. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se retira de la resina y se retiran los grupos protectores y, si es necesario, se forman enlaces de disulfuro para obtener el polipéptido objetivo.

40 Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, se puede utilizar una diversidad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, tales como HATU, HCTU, o, por ejemplo, una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, *N,N*-di-isopropil-carbodiimida y *N*-etil-*N'*-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida. Para la activación con dicho reactivo, se puede utilizar un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, HOBt u Oxima Pura. El aminoácido protegido se puede añadir directamente a la resina junto con los reactivos de activación y el inhibidor de racemización, o se puede activar anteriormente como un anhídrido de ácido simétrico, éster de HOBt, o éster de HOObt y entonces se añade a la resina. El disolvente para la activación de los aminoácidos protegidos o para la condensación con la resina, se puede seleccionar apropiadamente de entre los disolventes que son conocidos por ser útiles para las reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, sulfóxido de dimetilo (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF), piridina, dioxano, cloruro de metileno, THF, acetonitrilo, acetato de etilo, o las mezclas adecuadas de los mismos.

50 La temperatura de la reacción se puede seleccionar de entre el intervalo conocido hasta ahora como útil para la formación del enlace peptídico y por lo general se selecciona entre el intervalo de aproximadamente -20 °C a 50 °C.

El derivado de aminoácido activado se utiliza en general en una proporción de un exceso de 1,5 a 4 veces. Si se encuentra que la condensación es insuficiente de acuerdo con un ensayo que utilice la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin retirar el grupo protector. Si una condensación repetida todavía fracasa para proporcionar un grado de condensación suficiente, el grupo sin reaccionar se puede acetilar con anhídrido acético o con acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino para el aminoácido de material de partida incluye Z, Boc, amiloxicarbonilo terciario, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioílo, o Fmoc. El grupo protector de carboxilo que se puede utilizar incluye, pero no se limita a, los grupos alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ y aril C₆₋₁₀-alquilo C₁₋₂ anteriormente mencionados, así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, terbutoxicarbonilhidrazido y tritilhidrazido.

El grupo hidroxilo de serina y treonina se puede proteger mediante una esterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha esterificación incluye los grupos derivados de carbono, tales como los grupos alcanoilo inferior, por ejemplo, acetilo etc., los grupos aroílo, por ejemplo, benzoílo etc., benciloxicarbonilo y etoxicarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación incluye bencilo, tetrahidropiranilo y terbutilo. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de tirosina incluye Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z y terbutilo.

El grupo protector de imidazol para la histidina incluye Tos, 4-metoxi-2,3,6-trietilbencensulfonilo, DNP, benciloximetilo, Bum, Boc, Trt y Fmoc.

El grupo carboxilo activado del aminoácido de partida incluye el anhídrido de ácido correspondiente, azida y los ésteres activos, por ejemplo, los ésteres con alcoholes, tales como pentaclorofenol, 2,4,5-tricloro-fenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxifitalimida, HOBt, etc. El grupo amino activado del aminoácido de partida incluye la fosforamida correspondiente.

El método para la eliminación de los grupos protectores incluye la reducción catalítica utilizando hidrógeno gaseoso en presencia de un catalizador, tal como negro de paladio o paladio sobre carbono, el tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, o una mezcla de estos ácidos, el tratamiento básico con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, la reducción con metal de sodio en amoníaco líquido. La reacción de eliminación mediante el tratamiento ácido anteriormente mencionado se realiza en general a una temperatura de -20 °C a 40 °C y se puede conducir convenientemente con la adición de un aceptor de cationes, tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanditiol, 1,2-etanditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado para proteger al grupo imidazol de la histidina se puede eliminar mediante el tratamiento con tiofenol, mientras que el grupo formilo utilizado para proteger al grupo indol del triptófano se puede eliminar mediante el tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido de sodio o con amoníaco acuoso diluido, así como mediante el tratamiento ácido anteriormente mencionado, en presencia de 1,2-etanditiol o 1,4-butanditiol.

El método para proteger los grupos funcionales que no deban tomar parte en la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden utilizar, el método para retirar los grupos protectores y el método para activar los grupos funcionales que vayan a tomar parte en la reacción, se pueden seleccionar todos con un buen juicio de entre los grupos y métodos conocidos.

Otro método para obtener la forma de amida del polipéptido comprende amidar en primer lugar el grupo -carboxilo del aminoácido C-terminal, después prolongar la cadena del péptido hasta el lado N hasta la longitud deseada de la cadena y después desproteger selectivamente el grupo α-amino del péptido C-terminal y el grupo α-carboxilo del aminoácido o péptido que vaya a formar el resto del polipéptido objetivo y condensar los dos fragmentos cuyos grupo α-amino y grupos funcionales de cadena lateral se hayan protegido con grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un disolvente mixto, tal como el mencionado anteriormente en el presente documento. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser los mismos que se describen anteriormente en el presente documento. A partir del péptido protegido obtenido mediante condensación, se retiran todos los grupos protectores mediante el método anteriormente descrito, para proporcionar de esta manera el péptido en bruto deseado. Este péptido en bruto se puede purificar mediante los procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal se puede liofilizar para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Con el fin de obtener un éster del polipéptido, el grupo α-carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para proporcionar un éster de aminoácido y después, se sigue el procedimiento descrito anteriormente para la producción de la amida.

Los polipéptidos de la presente invención, o una amida, un éster o una sal de los mismos, se pueden administrar en cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por inhalación, etc. En las realizaciones particularmente preferidas de la invención se emplea la administración intravenosa continua de los polipéptidos de la presente invención, o de una amida, un éster, o una sal de los mismos. Los polipéptidos de la presente invención se pueden administrar como un bolo o como una

infusión continua durante un período de tiempo. Se puede utilizar una bomba implantable. En ciertas realizaciones de la invención, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se continúa durante uno a varios días (por ejemplo, 2 a 3 o más días), o durante períodos de tiempo más largos, por ejemplo, semanas, meses, o años. En algunas realizaciones, se proporciona la administración intermitente o continua del polipéptido durante al menos aproximadamente 3 días. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se proporciona durante al menos aproximadamente una semana. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se proporciona durante al menos aproximadamente dos semanas. Puede ser deseable mantener una concentración promedio del polipéptido en plasma por encima de un valor umbral particular, ya sea durante la administración o bien entre la administración de múltiples dosis. Una concentración deseable se puede determinar, por ejemplo, basándose en la condición fisiológica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, etc. Dichos valores recomendables se pueden identificar realizando ensayos clínicos convencionales.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de la presente invención o una amida, un éster o una sal del mismo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica se puede formular para vías de administración particulares, tales como administración oral, administración parenteral y administración rectal, etc. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden configurar en una forma sólida (incluyendo, sin limitación, cápsulas, comprimidos, píldoras, gránulos, liofilizados, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a las operaciones farmacéuticas convencionales, tales como elaboración aséptica, esterilización, y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes formadores de torta, agentes de tonicidad, agentes lubricantes, o agentes reguladores, así como adyuvantes, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y reguladores del pH, etc.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable normalmente incluyen soluciones acuosas estériles (que sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.), o suero tamponado con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en que se pueda pasar fácilmente por jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento y se deben conservar contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, aminoácidos, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas y los supositorios convenientemente se preparan a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente y contienen aproximadamente el 0,1-75 %, o contienen aproximadamente el 1-50 %, del ingrediente activo.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o con una combinación de ingredientes anteriormente enumerados, según se requieran, seguida de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado por congelación, lo cual proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo anteriormente filtrada para esterilizarse.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede utilizar en la forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para utilizarse como un enjuague bucal. Se pueden incluir agentes

5 aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto, o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; una sustancia de deslizamiento, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Las formulaciones para la entrega oral pueden incorporar convenientemente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para potenciar la absorción.

10 Para la administración mediante inhalación, los agentes terapéuticos de la invención preferentemente se entregan en forma de una aspersión en aerosol a partir de un recipiente o dosificador presurizado que contenga un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Se observa que los pulmones proporcionan una gran área superficial para la entrega sistémica de los agentes terapéuticos.

15 Los agentes se pueden encapsular, por ejemplo, en micropartículas poliméricas, tales como las descritas en la Publicación de los EE.UU. N.º 20040096403, o en asociación con cualquiera de una amplia diversidad de otros vehículos de entrega de fármacos que son conocidos en la materia. En otras realizaciones de la invención, los agentes se entregan en asociación con un lípido cargado como se describe, por ejemplo, en la Publicación de los EE.UU. N.º 20040062718. Se observa que este último sistema se ha utilizado para la administración de un polipéptido terapéutico, insulina, demostrando la utilidad de este sistema para la administración de agentes peptídicos.

20 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos.

25 Las composiciones adecuadas para su aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención con un vehículo adecuado. Los vehículos adecuados para la entrega transdérmica incluyen disolventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del hospedador. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en forma de un parche que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de velocidad para entregar el compuesto de la piel del hospedador a una velocidad controlada y anteriormente determinada durante un período de tiempo prolongado y elementos para asegurar el dispositivo a la piel.

30 Las composiciones adecuadas para su aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y a los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, pomadas, cremas, geles o formulaciones pulverizables, por ejemplo, para su entrega mediante aerosol o similares. Dichos sistemas de entrega tópica serán particularmente apropiados para la aplicación dérmica. Por tanto, son adecuados en particular para utilizarse en formulaciones tópicas, incluyendo cosméticas, bien conocidas en la técnica. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

35 Como se utiliza en el presente documento, una aplicación tópica también puede pertenecer a una inhalación o a una aplicación intranasal. Se pueden entregar de una manera conveniente en la forma de un polvo seco (ya sea solos, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, o bien como una partícula componente mezclada, por ejemplo, con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o de una presentación de aspersión en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado.

40 La invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a que se descompondrá el compuesto de la presente invención, como un ingrediente activo. Dichos agentes, que en el presente documento se denominan "estabilizantes", incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, tampones o tampones de sal, etc.

45 **Método de la Invención:**

La familia de péptidos de apelina es la única familia de ligandos naturales conocidos para el receptor APJ acoplado a proteína G. El gen de apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12 y la forma de apelina-13 modificada por piroglutamato (Pyr1-apelina-13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, después de unirse al receptor APJ, transduce la señal por medio de las proteínas Gi y Gq. En los cardiomiocitos, el acoplamiento de Gi o Gq conduce a cambios en el pH intracelular, en la activación de PLC y en la producción de IP3 que potencia la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y por último dan como resultado un aumento en la contractilidad cardíaca. El acoplamiento de Gi inhibe la Gs activada, la ciclasa de adenililo y la producción de AMPc y aumenta los niveles de pAkt, lo cual conduce a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, con la activación de APJ por medio de Gi, la pAKT conduce a un aumento en la producción de óxido nítrico (NO), que aumenta la

relajación del músculo liso, lo que da como resultado una vasodilatación global.

Los pacientes con insuficiencia cardíaca estable crónica tienen episodios agudos ocasionales de descompensación, en los que la contractilidad cardíaca declina adicionalmente y empeoran los síntomas. Dichas exacerbaciones se denominan insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA). Las terapias actuales para insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA) incluyen diuréticos, vasodilatadores e inótrupos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inótrupos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) son bien conocidos por sus eventos adversos, tales como arritmia y un aumento en la mortalidad a largo plazo. Los análogos de polipéptidos de apelina sintéticos de la presente invención proporcionan una terapia para la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA) que aumenta la contractilidad cardíaca sin inconvenientes arritmógenos o de mortalidad y que resuelve la enorme necesidad médica insatisfecha en la insuficiencia cardíaca crónica.

De hecho, el tratamiento agudo con apelina (5 minutos) en los seres humanos, da como resultado vasodilatación coronaria y un mejor gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas presentan un $t_{1/2}$ muy corto (segundos) y una duración de acción muy corta (unos cuantos minutos) in vivo. Los potentes agonistas de péptidos de apelina sintéticos de la presente invención tienen semividas más largas comparándose con la apelina nativa.

La activación del receptor APJ en los cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardíaca por medio de Gi/Gq, PLC y Ca²⁺ y b) proporciona cardioprotección por medio de Gi, la activación de pAkt, pero sin aumentar la AMPc (como se ve con otros inótrupos). Además, el agonismo de APJ en las células endoteliales conduce a la vasodilatación arterial, que beneficia adicionalmente a la insuficiencia cardíaca mediante la descarga del trabajo del ventrículo izquierdo. Tomados juntos, los análogos de los polipéptidos de apelina sintéticos pueden mejorar la función cardíaca global, reducir la arritmogénesis y proporcionar el beneficio de la sobrevivencia.

Más recientemente, ha habido una serie de publicaciones de investigación preclínica que se enfocan en la implicación potencial de la apelina en la diabetes y la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la apelina: 1) disminuye los niveles de glucosa en sangre mediante el mejoramiento de la captación de glucosa en el músculo, en el tejido adiposo y en el corazón, 2) protege a las células beta pancreáticas del estrés ER y la posterior apoptosis, 3) disminuye la secreción de insulina en las células beta y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en el tejido adiposo. La activación de la vía de pAKT se ha implicado en estos procesos.

Los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, presentan valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor APJ, por ejemplo, como se indica en los ensayos *in vitro* e *in vivo* proporcionadas en las siguientes secciones y, en consecuencia, se indican para terapia.

Los polipéptidos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada entre la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

Por tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad que esté asociada a la actividad del receptor APJ. En una realización adicional, la terapia se selecciona entre una enfermedad que responda al agonismo del receptor APJ. En otra realización, la enfermedad se selecciona entre la lista anteriormente mencionada, de una manera adecuada insuficiencia cardíaca descompensada aguda. En todavía otro subconjunto de esta realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, éster o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que esté asociada a la actividad del receptor APJ.

Por tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona entre una enfermedad que se pueda tratar mediante la activación (agonismo) del receptor APJ.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que responda al agonismo del receptor APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo. En una realización adicional, la enfermedad se selecciona entre la lista anteriormente mencionada, de una manera

adecuada insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

En otro subconjunto más de esta realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que esté asociada a la actividad del receptor APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

La cantidad eficaz de una composición o combinación farmacéutica de la invención que se deba emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, en consecuencia, variarán dependiendo, en parte, de la molécula entregada, de la indicación para que se esté utilizando la variante de proteína de fusión, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y la condición (la edad y la salud general) del paciente. En consecuencia, el facultativo puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación normal puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar de 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 µg/ kg a aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de doble función en la formulación que se esté utilizando. Normalmente, un facultativo administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. La composición, en consecuencia, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o de un catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada se hace rutinariamente por los expertos habituales en la materia y está dentro del ámbito de las tareas que ellos hacen rutinariamente. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de los datos de respuesta a la dosis apropiados.

La actividad de un polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede evaluar siguiendo los métodos *in vitro* que se describen a continuación.

Ensayo de flujo de calcio de hAPJ:

Se cultivaron en placas células Chem-5 APJ estables (Millipore n.º HTS068C) en un formato de 384 pocillos con 10.000 células/pocillo en 25 µl de medio de crecimiento, después se cultivaron durante 24 horas en una incubadora de cultivo de tejido a 37 °C. Una hora antes del ensayo, se añadieron 25 µl/pocillo de colorante de Calcio 4 FLIPR (Molecular Devices R8142) con probenecid 2,5 mM y las células se incubaron durante una hora en una incubadora de cultivo de tejido a 37 °C. Los péptidos se solubilizaron en regulador de HBSS, HEPES y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % y se diluyeron en serie 10 veces, desde 50 uM hasta 5 pM, por triplicado. Se utilizó FLIPR Tetra para añadir el péptido a las células con el colorante (1:5, para concentraciones del péptido final que varían de 10 uM a 1 pM). El colorante FLIPR dentro de las células emitió fluorescencia después del enlace con calcio, mientras que la fluorescencia a partir de las células externas se enmascaró. La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación de 470-495 y de emisión de 515-575 en el FLIPR Tetra. Las lecturas se hicieron durante 3 minutos en total, empezando 10 segundos antes de la adición del péptido. Se calcularon los valores máximo-mínimo y se representaron gráficamente para cada concentración de péptido y se utilizó el software GraphPad Prism para calcular los valores de CE₅₀ en los puntos de inflexión de la curva, para determinar la estimulación del flujo de calcio por parte de los péptidos.

Ensayo de estabilidad en plasma:

Materiales:

Solución de trabajo: Se prepara 1 mg/ml del artículo de ensayo en agua Milli-Q.

Solución de extracción: Metanol:Acetonitrilo:Agua (1:1:1) con ácido fórmico al 0,1 % y 400 ng/ml de Gliburida.

Plasma: Plasma de rata Sprague-Dawley macho (con heparina de sodio), adquirido en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY).

Sangre entera: Sangre entera de rata Sprague Dawley macho (con heparina de sodio), adquirida en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY).

Homogenizado de pulmón: El pulmón de rata Sprague Dawley macho se adquirió en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY). El pulmón se homogeneizó utilizando un homogeneizador Polytron después de la adición de 5 veces el volumen de suero tamponado con fosfato (PBS) 1X. El homogenato se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a

4 °C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 30 min para hacer un sobrenadante transparente. La concentración de proteína se determinó utilizando un kit comercial (Pierce, Thermo Scientific).

Procedimiento de preparación de muestras:

5 El artículo de ensayo se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: plasma de rata heparinizado, sangre entera de rata heparinizada u homogenizado de pulmón. La muestra de plasma y sangre entera se preparó a 5000 ng/ml mediante la adición de 5 ul de una solución de trabajo de 1 mg/ml a 995 ul de plasma de rata o sangre entera. Las muestras de homogenizado de pulmón se prepararon mediante la dilución del homogenizado de pulmón en una concentración de 1 mg/ml de proteína con suero tamponado con fosfato (PBS), seguida de la adición de 5 ul de la solución de trabajo a 995 µl de homogenizado de pulmón diluido. Las muestras se incubaron a 37 °C con
10 agitación suave (65-75 rpm) en una incubadora con un baño de agua. En los tiempos de 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 y 240 min, se transfirieron alícuotas de 25 ul de muestras de incubación a la placa de 96 pocillos e inmediatamente se precipitó la proteína utilizando 150 ul de la solución de extracción. Después de completarse el experimento de incubación, la placa de muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 min. Después, se utilizó un dispositivo pipeteador (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y añadir 50 ul de agua a todas
15 las muestras. La placa se agitó con formación de vórtice antes del análisis por CL-EM.

CL_EM Análisis de muestras de estabilidad

HPLC: HPLC Agilent 1290 con automuestreador.

Columna: MAC-MOD ECA C18, 3 µm, 30 ml x 2,1 ml de d.i.

Fase móvil A: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.

20 Fase móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Tiempo (min)	Programa de gradiente:		
	Flujo (ml)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	0,4	95	5
0,5	0,4	95	5
1,5	0,4	5	95
4,1	0,4	5	95
4,2	0,4	95	5
5	0,4	95	5

Espectrómetro de masas: Agilent Q-TOF 6530.

25 Modo de adquisición de datos: Barrido completo con intervalo de masas de 100-1000 m/z.

Software de adquisición y análisis de datos: MassHunter.

Análisis de datos:

Ensayo de estabilidad: Estabilidad semivida, ($t_{1/2}$), los valores se determinaron mediante la conversión de las áreas pico en cada punto del tiempo hasta el porcentaje en relación con el área pico inicial ($t = 0$).

$$\text{Porcentaje restante} = 100 \times (\text{área pico de muestra}) \div (t = 0 \text{ área pico}).$$

30 El log natural de los valores de porcentaje restante se calculó y se representó gráficamente frente al tiempo de muestreo (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó mediante regresión lineal (Microsoft Excel).

Después se calculó la estabilidad de la semivida mediante la fórmula, $t_{1/2} = 0,693 \div k$.

Ensayo de estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada:

35 Se siguió el protocolo de flujo de calcio descrito anteriormente, con los siguientes cambios. Los péptidos también se incubaron con plasma de rata al 5 % (Bioreclamation n.º RATPLNAHP-M, tratado con heparina de sodio). Se tomaron lecturas en los puntos temporales t_0 y t_{24} horas, después de la incubación en una incubadora de cultivo de tejido a 37 °C. Se estimó la semivida en plasma del péptido mediante el cálculo de los siguientes:

- 1) $LN ((CE_{50} \text{ en } t_0)/(CE_{50} \text{ en } t_{24} \text{ horas}))$,
- 2) Calcular la pendiente del valor anterior y
- 3) $t_{1/2} = 0,693/(\text{pendiente}^2)$.

5 Utilizando el ensayo (como se ha descrito anteriormente) los polipéptidos de la invención presentaron una eficacia y una estabilidad de acuerdo con las Tablas 2 y 3, que se proporcionan a continuación.

Tabla 2: Actividad y Estabilidad de Polipéptidos

Péptido	CE₅₀ de Flujo de Ca²⁺ hAPJ [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t_{1/2} [min]
Ejemplo 8	1,04	407
Ejemplo 9	2,16	>1000
Ejemplo 10	2,54	>1000
Ejemplo 11	3,52	>1000
Ejemplo 12	2,07	93,6
Ejemplo 13	2,26	283,6
Ejemplo 14	8,83	85,2
Ejemplo 15	3,53	180,3
Ejemplo 16	1,43	13,4
Ejemplo 17	3,29	14,1
Ejemplo 18	1,62	248,1
Ejemplo 19	8,46	28,4
Ejemplo 20	173,24	490,4
Ejemplo 21	75,81	639,7
Ejemplo 22	42,03	799,9
Ejemplo 23	52,42	>1000
Ejemplo 24	32,65	303,5
Ejemplo 25	24,50	>1000
Ejemplo 26	29,84	>1000
Ejemplo 27	65,55	>1000
Ejemplo 50	1,92	>1000
Ejemplo 51	1,09	655,9
Ejemplo 52	53,88	777,8

Péptido	CE₅₀ de Flujo de Ca²⁺ hAPJ [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t_{1/2} [min]
Ejemplo 53	1,07	>1000
Ejemplo 54	6,70	>1000
Ejemplo 55	8,16	>1000
Ejemplo 56	1,12	>1000
Ejemplo 57	2,01	>1000
Ejemplo 58	13,09	>1000
Ejemplo 59	10,00	>1000
Ejemplo 60	8,15	>1000
Ejemplo 61	89,15	259,9
Ejemplo 62	3,32	>1000
Ejemplo 63	3,18	703,9
Ejemplo comparativo: Pyr1-apelina-13	1,79	5,0

Tabla 3: Correlación entre el ensayo de estabilidad en plasma y el ensayo de estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada

Péptido	Estabilidad en plasma t_{1/2} [min]	Estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada t_{1/2} [min]
Ejemplo 8	163	407
Ejemplo 12	53,9	96,16
Ejemplo 13	183	283,6
Ejemplo 14	63	85,2
Ejemplo 16	10,2	13,4
Ejemplo 17	2,3	14,1
Ejemplo 18	220	248,1
Pyr-1-Apelina 13	6,6	5,0

5 El polipéptido de la presente invención puede tener una potencia del receptor APJ similar a la de la apelina-13 o pyr-1-apelina-13. En una realización, el polipéptido de la presente invención tiene una CE₅₀ de menos de 100 nM. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una CE₅₀ de menos de 50 nM, preferentemente de menos de 25 nM y más preferentemente menos de 15 nM. En otra realización más, el polipéptido de la presente invención tiene una CE₅₀ de menos de 10 nM.

10 El polipéptido de la presente invención puede tener una estabilidad en plasma superior a la de la apelina-13 o pyr-1-apelina-13. En una realización, la mejora en la estabilidad en plasma es de al menos 2 veces. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 30 minutos. En otra realización, el

polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 10 minutos, de al menos 40 min y más preferentemente al menos 60 minutos.

5 El polipéptido de la presente invención se puede administrar ya sea simultáneamente con, o antes o después de, uno o más agentes terapéuticos diferentes. El polipéptido de la presente invención se puede administrar por separado, por la misma o diferente vía de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica que los otros agentes.

10 En una realización, la invención proporciona un producto que comprende un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo y al menos otro agente terapéutico, como una preparación combinada para su uso simultáneo, por separado o secuencial, en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o afección que responde a la activación del receptor APJ.

15 Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo y otro u otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo y el otro u otros agentes terapéuticos en forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo y otro u otros agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se ha descrito anteriormente.

20 En una realización, la invención proporciona un kit, que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, de las que al menos una contiene un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo. En una realización, el kit comprende elementos para contener por separado dichas composiciones, tales como un recipiente, un frasco dividido, o un paquete de papel de aluminio dividido. Un ejemplo de este kit es un envase blíster, como se utiliza normalmente para el envasado de comprimidos, cápsulas y similares.

El kit de la invención se puede utilizar para administrar formas de dosificación diferentes, por ejemplo, orales y parenterales, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas una frente a la otra. Para ayudar al cumplimiento, el kit de la invención normalmente comprende instrucciones para la administración.

30 En las terapias de combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico pueden fabricarse y/o formularse por el mismo o por diferentes fabricantes. Además, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico, se pueden reunir en una terapia de combinación: (i) antes de liberar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo, en el caso de un kit que comprenda el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la guía del médico) poco antes de la administración; (iii) en los pacientes mismos, por ejemplo, durante la administración en secuencia de un polipéptido de la invención y el otro agente terapéutico.

35 En consecuencia, la invención proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el medicamento se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de apelina, en el que el medicamento se administra con un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

40 La invención también proporciona un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo, se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el otro agente terapéutico se prepara para su administración con un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o con una amida, un éster o una sal del mismo. La invención también proporciona un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o una amida, un éster o una sal del mismo, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de una

cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

5 La invención también proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el paciente ha sido tratado anteriormente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, en el que el paciente ha sido tratado anteriormente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

10 En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona entre inótrpos, bloqueantes de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueantes del canal de calcio (BCC), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueantes de los receptores de aldosterona, bloqueantes de los receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (IAS), un inhibidor de CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y un inhibidor de NEP.

15 La expresión “en combinación con” un segundo agente o tratamiento incluye la coadministración del polipéptido de la invención (por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o un polipéptido descrito de otra manera en el presente documento) con el segundo agente o tratamiento; en primer lugar la administración del compuesto de la invención, seguido del segundo agente o tratamiento y en primer lugar la administración del segundo agente o tratamiento, seguido del compuesto de la invención.

20 La expresión “segundo agente” incluye cualquier agente que sea conocido en la materia para tratar, prevenir, o reducir los síntomas de una enfermedad o de un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, un trastorno o enfermedad que responda a la activación del receptor APJ, tal como, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

30 Los ejemplos de los segundos agentes incluyen inótrpos, bloqueantes de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueantes del canal de calcio (BCC), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueantes de los receptores de aldosterona, bloqueantes de los receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (IAS), un inhibidor de CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y/o un inhibidor de NEP.

35 Los inótrpos, como se utilizan en el presente documento, incluyen, por ejemplo, dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendán, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol y digoxina.

Los bloqueantes de los receptores beta-adrenérgicos, como se utilizan en el presente documento, incluyen, por ejemplo, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol.

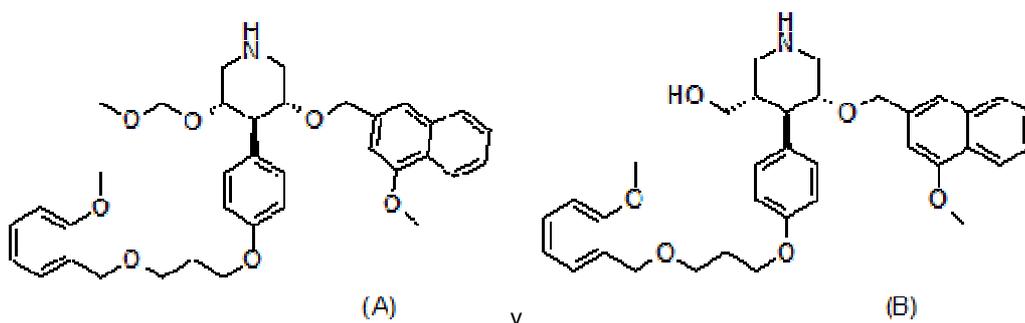
40 Los anticoagulantes, como se utilizan en el presente documento, incluyen Dalteparina, Danaparoid, Enoxaparina, Heparina, Tinzaparina, Warfarina.

45 La expresión “inhibidor de HMG-Co-A-reductasa” (también denominados como inhibidores de beta-hidroxi-beta-metil-glutaril-co-enzima-A-reductasa) incluye los agentes activos que se pueden utilizar para disminuir los niveles de lípidos, incluyendo el colesterol en sangre. Los ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina, rivastatina, simvastatina y velostatina, o las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

50 La expresión “inhibidor de la ECA” (también denominados como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) incluye las moléculas que interrumpen la degradación enzimática de la angiotensina I hasta la angiotensina II. Dichos compuestos se pueden utilizar para la regulación de la presión sanguínea y para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. Los ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilato, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilato, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril y trandolapril, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La expresión "antagonista de endotelina" incluye bosentán (véase el documento EP 526708 A), tezosentán (véase el documento WO 96/19459), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La expresión "inhibidor de renina" incluye ditekirén (nombre químico: [1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-dimetil-etoxi)-carbonil]-L-prolil-L-fenilalanil-N-[2-hidroxi-5-metil-1-(2-metil-propil)-4-[[[2-metil-1-[(2-piridinil-metil)-amino]-carbonil]-butil-amino]-carbonil]-hexil]-N-alfa-metil-L-histidinamida); terlakirén (nombre químico: [R-(R*,S*)]-N-(4-morfolinil-carbonil)-1-fenilalanil-N-[1-(ciclohexil-metil)-2-hidroxi-3-(1-metil-etoxi)-3-oxo-propil]-S-metil-L-cisteína-amida); Aliskirén (nombre químico: (2S,4S,5S,7S)-5-amino-N-(2-carbamoil-2,2-dimetil-etil)-4-hidroxi-7-{[4-metoxi-3-(3-metoxi-propoxi)-fenil]-metil}-8-metil-2-(propan-2-il)-nonanamida) y zankirén (nombre químico: [1S-[1R*(R*(R*)),2S*,3R*]]-N-[1-(ciclohexil-metil)-2,3-dihidroxi-5-metil-hexil]-alfa-[[2-[[[4-metil-1-piperazinil]-sulfonil]-metil]-1-oxo-3-fenil-propil]-amino]-4-tiazol-propanamida), o las sales de clorhidrato de los mismos, o SPP630, SPP635 y SPP800 como son desarrollados por Speedel, o RO 66-1132 y RO 66-1168 de las fórmulas (A) y (B):



o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "aliskirén", si no se define de una manera específica, se debe entender tanto como la base libre y como una sal del mismo, en especial una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferentemente una sal de hemi-fumarato del mismo.

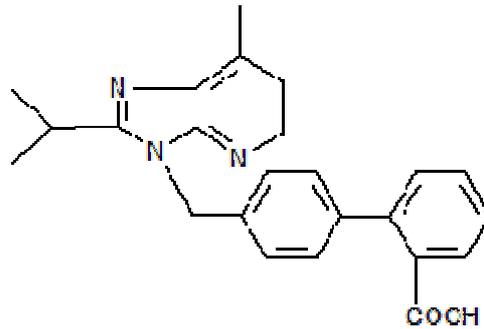
La expresión "bloqueante del canal de calcio (BCC)" incluye dihidropiridinas (DHP) y no dihidropiridinas (no DHP) (por ejemplo, los bloqueantes del canal de calcio (BCC) de tipo diltiazem y de tipo verapamilo). Los ejemplos incluyen amlodipino, Bepridil, Diltiazem, felodipino, riosidina, isradipino, lacidipino, nicardipino, nifedipino, niguldipino, niludipino, nimodipino, nisoldipino, nitrendipino, Verapamilo y nivaldipino y es preferentemente un representante de no dihidropiridina (no-DHP) seleccionado entre el grupo que consiste en flunarizina, prenilamina, diltiazem, fendilina, galopamilo, mibefradilo, anipamilo, tiapamilo y verapamilo, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los bloqueantes del canal de calcio (BCC) se pueden utilizar como fármacos antihipertensivos, antianginosos o antiarrítmicos.

El término "diurético" incluye derivados de tiazida (por ejemplo, clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida y clortalidona).

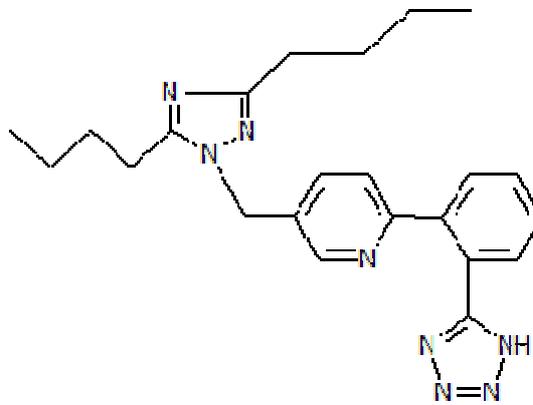
El término "mimético de ApoA-I" incluye los péptidos D4F (por ejemplo, de Fórmula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F).

Se entiende que un antagonista del receptor de angiotensina II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un ingrediente activo que se une al subtipo de receptor AT1 del receptor de angiotensina II, pero que no da como resultado la activación del receptor. Como una consecuencia de la inhibición del receptor AT1, estos antagonistas se pueden emplear, por ejemplo, como antihipertensivos, o para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

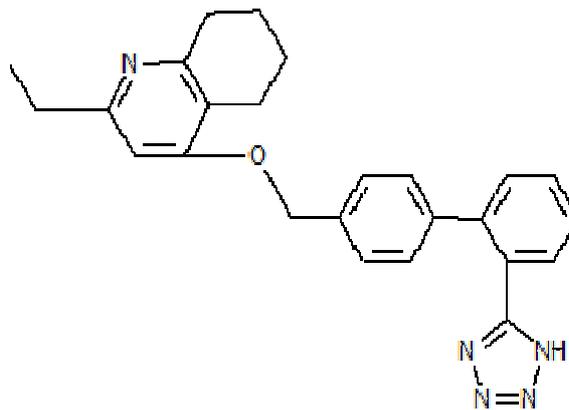
La clase de antagonistas del receptor AT1 comprende los compuestos que tienen diferentes características estructurales y se prefieren esencialmente los no peptídicos. Por ejemplo, se puede hacer mención de los compuestos que se seleccionan a partir del grupo que consiste en valsartán, losartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, saprisartán, tasosartán, telmisartán, el compuesto con la designación E-1477 de la siguiente fórmula:



el compuesto con la designación SC-52458 de la siguiente fórmula:



y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula:



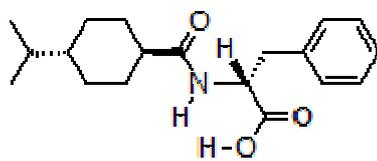
5

o, en cada caso, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Son antagonistas del receptor AT1 preferidos candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, telmisartán, valsartán. También se prefieren los agentes que han sido comercializados, más preferentemente valsartán, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 La expresión "agente antidiabético" incluye la secreción de potenciadores de insulina que promuevan la secreción de insulina a partir de las células β pancreáticas. Los ejemplos incluyen derivados de biguanida (por ejemplo, metformina), sulfonilureas (SU) (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-cloro-N-[(1-pirrolidinil-amino)-carbonil]-bencenosulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepida, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina,
- 15 glipinamida, fenbutamida y tolil-ciclamida), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otros ejemplos

incluyen los derivados de fenilalanina (por ejemplo, nateglinida [*N*-(trans-4-isopropil-ciclohexil-carbonil)-*D*-fenilalanina] (véanse el documento EP 196222 y el documento EP 526171) de fórmula:



- 5 repaglinida [ácido (*S*)-2-etoxi-4-{2-[[3-metil-1-[2-(1-piperidinil)-fenil]-butil]-amino]-2-oxo-etil}-benzoico] (véanse el documento EP 589874, el documento EP 147850 A2, en particular el Ejemplo 11 en la página 61 y el documento EP 207331 A1); dihidrato de (2*S*)-2-bencil-3-(cis-hexahidro-2-isoindolinil-carbonil)-propionato de calcio (por ejemplo, mitiglinida (véase el documento EP 507534)); y glimepirida (véase el documento EP 31058).

Otros ejemplos de segundos agentes con los que se pueden utilizar el péptido y el polipéptido de la invención en combinación incluyen inhibidores de DPP-IV, GLP-1 y agonistas de GLP-1.

- 10 DPP-IV es responsable de inactivar el GLP-1. De una manera más particular, la DPP-IV genera un antagonista de los receptores de GLP-1 y de esta manera, reduce la respuesta fisiológica al GLP-1. GLP-1 es un estimulante mayor de la secreción de la insulina pancreática y tiene efectos beneficiosos directos sobre la eliminación de la glucosa.

- 15 El inhibidor de DPP-IV (dipeptidil-peptidasa IV) puede ser peptídico o, preferentemente, no peptídico. Se desvelan inhibidores de DPP-IV en cada caso genéricamente y específicamente, por ejemplo, en el documento WO 98/19998, el documento DE 196 16 486 A1, el documento WO 00/34241 y el documento WO 95/15309, en cada caso en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo. Se prefieren los compuestos que se desvelan específicamente en el Ejemplo 3 del documento WO 98/19998 y en el Ejemplo 1 del documento WO 00/34241, respectivamente.

- 20 GLP-1 (péptido tipo glucagon-1) es una proteína insulínica que es descrita, por ejemplo, por W.E. Schmidt et al., en *Diabetologia*, 28, 1985, 704-707 y en el documento US 5.705.483.

- 25 La expresión "agonistas de GLP-1" incluye las variantes y los análogos de GLP-1(7-36)NH₂ que se desvelan en particular en el documento US 5.120.712, el documento US 5.118.666, el documento US 5.512.549, el documento WO 91/11457 y por C. Orskov et al. en *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12826. Otros ejemplos incluyen GLP-1(7-37), en cuyo compuesto, la funcionalidad amida carboxi-terminal de Arg³⁶ se desplaza con Gly en la 37a posición de la molécula de GLP-1(7-36)NH₂ y las variantes y los análogos del mismo, incluyendo GLN³⁶-GLP-1(7-37), D-GLN³⁶-GLP-1(7-37), acetilo LYS⁹-GLP-1(7-37), LYS¹⁸-GLP-1(7-37) y, en particular, GLP-1(7-37)OH, VAL⁸-GLP-1(7-37), GLY⁸-GLP-1(7-37), THR⁸-GLP-1(7-37), MET⁸-GLP-1(7-37) y 4-imidazopropionil-GLP-1. También se da una preferencia especial al análogo de agonista de GLP exendina-4, descrito por Greig et al., en *Diabetologia* 1999, 42, 45-50.

- 30 También se incluye en la definición de "agente antidiabético", la sensibilidad a los potenciadores de insulina que restablecen la función deteriorada de los receptores de insulina para reducir la resistencia a la insulina y, en consecuencia, para mejorar la sensibilidad a la insulina. Los ejemplos incluyen los derivados hipoglicémicos de tiazolidinadiona (por ejemplo, glitazona, (*S*))((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2H-1-benzopiran-6-il)-metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-[[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxo-propil)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (darglitazona), 5-[[4-(1-metil-ciclohexil)-metoxi]-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (ciglitazona), 5-[[4-(2-(1-indolil)-etoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (DRF2189), 5-[[4-(2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-etoxi)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (BM-13.1246), 5-(2-naftil-sulfonil)-tiazolidina-2,4-diona (AY-31637), bis-{4-[(2,4-dioxo-5-tiazolidinil)-metil]-fenil}-metano (YM268), 5-{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-2-hidroxi-etoxi]-bencil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-[4-(1-fenil-1-ciclopropan-carbonil-amino)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-[[4-(2-(2,3-dihidro-indol-1-il)-etoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil)]-2-propinil]-5-fenil-sulfonil]-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil)]-2-propinil]-5-(4-fluoro-fenil-sulfonil)-tiazolidina-2,4-diona, 5-[[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (rosiglitazona), 5-[[4-(2-(5-etil-2-piridil)-etoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (pioglitazona), 5-[[4-((3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-il)-metoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-[6-(2-fluoro-benciloxi)-naftalen-2-il-metil]-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-[[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (T-174) y 5-(2,4-dioxo-tiazolidin-5-il-metil)-2-metoxi-N-(4-trifluoro-metil-bencil)-benzamida (KRP297)).

- 45 Agentes antidiabéticos adicionales incluyen, moduladores de la vía de señalización de insulina, como los inhibidores de fosfatasa de proteína tirosina (PTPasas), compuestos miméticos de molécula no pequeña antidiabéticos e inhibidores de amido-transferasa de glutamina-fructosa-6-fosfato (GFAT); compuestos que tienen influencia sobre la producción de glucosa hepática mal regulada, como inhibidores de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-Bpasa), inhibidores de fosforilasa de glicógeno (GP), antagonistas del receptor de glucagon e inhibidores de carboxicinasa de fosfoenolpiruvato (PEPCK); inhibidores de cinasa de deshidrogenasa de

5 piruvato (PDHK); inhibidores del vaciado gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor de retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de las proteínas de desacoplamiento (UCP); agonistas de PPAR γ no de tipo glitazona; agonistas dobles de PPAR α /PPAR γ ; compuestos antidiabéticos que contienen vanadio; hormonas de incretina, como péptido tipo glucagon-1 (GLP-1) y agonistas de GLP-1; antagonistas de los receptores de imidazolina de células-beta; miglitol; antagonistas α_2 -adrenérgicos; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 En una realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados a partir de bloqueantes del receptor β -adrenérgico, tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas de los receptores de angiotensina II tales como bloqueantes de AT1; agentes antidiabéticos, tales como inhibidor de DPPIV (por ejemplo, vildagliptina) y agonista del péptido GLP1.

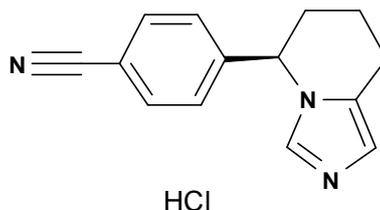
15 La expresión "agente reductor de la obesidad" incluye inhibidores de lipasa (por ejemplo, orlistat) y supresores del apetito (por ejemplo, sibutramina y fentermina).

20 Se entiende que un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un ingrediente activo que tiene la propiedad para inhibir la producción de aldosterona. La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una enzima del citocromo mitocondrial P450 que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, es decir, la conversión de la 11-desoxicorticosterona hasta la aldosterona. La inhibición de la producción de aldosterona con los denominados inhibidores de la aldosterona sintasa se conoce como una variante satisfactoria para el tratamiento de la hipocalcemia, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, la fibrilación auricular o la insuficiencia renal. Esta actividad de inhibición de la aldosterona sintasa es fácilmente determinada por los expertos en la materia de acuerdo con los ensayos convencionales (por ejemplo, el documento US 2007/0049616).

25 La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende los inhibidores tanto esteroideos como no esteroideos de la aldosterona sintasa y son más preferidos éstos últimos.

Se da preferencia a los inhibidores de la aldosterona sintasa disponibles en el mercado o a los inhibidores de la aldosterona sintasa que han sido aprobados por las autoridades de salud.

30 La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende los compuestos que tienen diferentes características estructurales. Un ejemplo de un inhibidor no esteroideo de la aldosterona sintasa es el (+)-enantiómero del clorhidrato de fadrozol (Patentes de los EE.UU. 4617307 y 4889861) de fórmula



o, si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en combinación son los compuestos y análogos genéricamente y específicamente desvelados, por ejemplo, en el documento US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo. Los inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados preferidos para su uso en el presente documento invención incluyen, sin limitación, 4-(6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-3-metil-benzonitrilo; (4-metoxi-bencil)-metil-amida del ácido 5-(2-cloro-4-ciano-fenil)-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-carboxílico; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5H-imidazo-[1,5-a]-azepin-5-il)-bifenil-3-carbonitrilo; butil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-2-metoxi-benzonitrilo; 4-fluoro-bencil-éster del ácido 5-(2-cloro-4-ciano-fenil)-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-carboxílico; metil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-trifluoro-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-carboxílico; 2-isopropoxi-etil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-2-metil-benzonitrilo; 4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-3-fluoro-benzonitrilo; 4-(6,7-di-hidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-2-metoxi-benzonitrilo; 3-fluoro-4-(7-metilen-6,7-dihidro-5H-pirrol-1,2-c)-imidazol-5-il)-benzonitrilo; cis-3-fluoro-4-[7-(4-fluoro-bencil)-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo-[1,5-a]-piridin-5-il)-benzonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-imidazo-[1,5-a]-azepin-5-il)-bifenil-3-carbonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-imidazo-[1,5-a]-azepin-5-il)-

bifenil-3-carbonitrilo o, en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La expresión inhibidores de la aldosterona sintasa también incluye los compuestos y análogos que se desvelan en el documento WO2008/076860, el documento WO2008/076336, el documento WO2008/076862, el documento WO2008/027284, el documento WO2004/046145, el documento WO2004/014914 y el documento WO2001/076574.

Adicionalmente, los inhibidores de la aldosterona sintasa también incluyen los compuestos y análogos que se desvelan en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N.º US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 y en las Solicitudes según el TCP WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 y en la Solicitud de Patente Europea EP 1886695. Los inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados preferidos para su uso en el presente documento invención incluyen, sin limitación, 8-(4-fluoro-fenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazina; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-2-fluoro-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-2,6-difluoro-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 3-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-ftalonitrilo; 4-(8-(4-ciano-fenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazin-8-il)-naftalen-1-carbonitrilo; 8-[4-(1*H*-tetrazol-5-il)-fenil]-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-*c*][1,4]-oxazina, como son desarrollados por Speedel o, en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son los compuestos y análogos genéricamente y específicamente desvelados, por ejemplo, en el documento WO 2009/156462 y el documento WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo. Los inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados preferidos para la combinación de la presente invención incluyen clorhidrato de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol-1-il-metil)-benzonitrilo, 1-(4-metanosulfonyl-bencil)-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol, 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1*H*-indol, etil-éster del ácido 5-(3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-nicotínico, *N*-[5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-etanosulfonamida, 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-éster del ácido pirrolidin-1-sulfónico, *N*-metil-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-metanosulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-[5-[(2-pirrolidin-1-il-etil-amino)-metil]-piridin-3-il]-1*H*-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metanosulfonyl-piperazin-1-il-metil)-piridin-3-il]-1-metil-1*H*-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-1-metil-2-[5-[(1-metil-piperidin-4-il-amino)-metil]-piridin-3-il]-1*H*-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-amida del ácido morfolin-4-carboxílico, *N*-[5-(6-cloro-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-etanosulfonamida, C,C,C-trifluoro-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-metanosulfonamida, *N*-[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluoro-metil-bencenosulfonamida, *N*-[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metanosulfonamida, *N*-(5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il)-butan-1-sulfonamida, *N*-(1-(5-(4-ciano-3-metoxi-fenil)-piridin-3-il)-etil)-etanosulfonamida, *N*-((5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il)(ciclopropil)-metil)-etanosulfonamida, *N*-(ciclopropil-(5-(1*H*-indol-5-il)-piridin-3-il)-metil)-etanosulfonamida, *N*-(ciclopropil-(5-naftalen-1-il-piridin-3-il)-metil)-etanosulfonamida, [5-(6-cloro-1-metil-1*H*-pirrolo-[2,3-*b*]-piridin-2-il)-piridin-3-il-metil]-amida del ácido etanosulfónico y {[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil}-etil-amida del ácido etanosulfónico.

La expresión "bloqueante de los receptores de endotelina" incluye bosentán y ambrisentán.

La expresión "inhibidor de CETP" se refiere a un compuesto que inhibe el transporte mediado por la proteína de transferencia de éster de colesterilo (CETP) de diversos ésteres de colesterilo y triglicéridos desde HDL hasta LDL y VLDL. Dicha actividad de inhibición de la proteína de transferencia de éster de colesterilo (CETP) realmente es determinada por los expertos en la materia de acuerdo con los ensayos convencionales (por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.140.343). Los ejemplos incluyen los compuestos que se desvelan en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.140.343 y 6.197.786 (por ejemplo, el éster etílico del ácido [2*R*,4*S*]4-[(3,5-bis-trifluoro-metil-bencil)-metoxi-carbonil-amino]-2-etil-6-trifluoro-metil-3,4-dihidro-2*H*-quinolin-1-carboxílico (torcetrapib); los compuestos que se desvelan en la Patente de los EE.UU. N.º 6.723.752 (por ejemplo, (2*R*)-3-[[3-(4-cloro-3-etil-fenoxi)-fenil]-[3-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-fenil]-metil]-amino)-1,1,1-trifluoro-2-propanol); los compuestos que se desvelan en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º de Serie 10/807,838; los derivados de polipéptidos que se desvelan en la Patente de los EE.UU. N.º 5.512.548; los derivados de rosenonolactona y los análogos de éster de colesterilo que contienen fosfato que se desvelan en *J. Antibiot.*, 49(8): 815- 816 (1996) y *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 6: 1951-1954 (1996), respectivamente. Adicionalmente, los inhibidores de la proteína de transferencia de éster de colesterilo (CETP) también incluyen aquellos que se desvelan en el documento WO2000/017165, el documento WO2005/095409, el documento WO2005/097806, el documento WO 2007/128568, el documento WO2008/009435, el documento WO 2009/059943 y el documento WO2009/071509.

La expresión "inhibidor de NEP" se refiere a un compuesto que inhibe la endopeptidasa neutra (NEP) EC 3,4.24,11. Los ejemplos incluyen Candoxatrilo, Candoxatrilat, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Sampatrilato, Fasidotril, Omapatrilat, Gemopatrilat, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 y el éster etílico del ácido (2*R*,4*S*)-5-bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionil-amino)-2-metil-pentanoico, o una sal farmacéuticamente

5 aceptable de los mismos. Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen los derivados dipeptídicos sustituidos por fosfono/biarilo, como se desvelan en la Patente de los EE.UU. N.º US 5.155.100. Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen al derivado de N-mercaptoacil-fenilalanina, como se desvela en la Solicitud según el TCP Número WO 2003/104200. Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen agentes de doble acción contra la hipertensión, como se desvelan en las Solicitudes según el TCP Números WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen los compuestos que se desvelan en las Solicitudes de los EE.UU. N.º 12/788,794; 12/788,766 y 12/947,029. Los inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen los compuestos que se desvelan en el documento WO 2010/136474, el documento WO 2010/136493, el documento WO 2011/061271 y en las Solicitudes Provisionales de los EE.UU. N.º 61/414171 y 61/414163.

10 En una realización, la invención proporciona un método para activar el receptor APJ en un sujeto, en el que el método comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

15 En una realización, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor APJ, en un sujeto, en el que el método comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

20 En una realización, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación (agonismo) del receptor APJ, en un sujeto, en el que el trastorno o la enfermedad se selecciona entre la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

25 En una realización, la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, para su uso como un medicamento.

30 En una realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor APJ. En otra realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de una cualquiera de las fórmulas II, III, IV o V, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor APJ, en el que este trastorno o enfermedad se selecciona en particular entre la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) y la preeclampsia.

Ejemplificación de la invención: Síntesis de péptidos y polipéptidos:

Abreviatura	Definición
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AM	Aminometilo
BAL	Enlazador de amida de la estructura base
BSA	Albúmina de suero bovino

Abreviatura	Definición
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
DCM	Dicloro-metano
DIC	<i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DVB	Divinilbenceno
EDT	Etranditiol
FA	Ácido fórmico
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBSS	Solución de sal regulada de Hank
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzo-triazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
ivDde	(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo
LN	Logarithmus naturalis (logaritmo natural)
MeOH	Metanol
EM	Espectrometría de masas
Nal	2-Naftilalanina
Nle	Norleucina
NMP	N-metilpirrolidina
Oxima Pura	2-ciano-2-(hidroxi-imino)-acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
pE	Piroglutamato
PG	Grupo protector
Ph	Fenilo
PS	Poliestireno
POL	Soporte de polímero
ta	Temperatura ambiente
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
tBuOH	<i>tert</i> -butanol
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
t _R	Tiempo de retención

Abreviatura	Definición
Trt	Tritilo
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra-alto rendimiento
UV	Ultravioleta

Los péptidos se sintetizaron mediante la química Fmoc en fase sólida convencional. Los péptidos se ensamblaron en el sintetizador de péptidos Prelude™ (Protein Technologies, Inc., Tucson, EE.UU.). Los péptidos con un ácido carboxílico libre sobre el extremo C se sintetizaron a partir de resina de cloruro de 2-clorotritilo-PS (ABCR, Karlsruhe, Alemania). Los péptidos con una carboxamida no sustituida sobre el extremo C se sintetizaron a partir de la resina Rink-Amida-AM-PS protegida por Fmoc (Merck, Darmstadt, Alemania). Los péptidos con una carboxamida N-mono-sustituida sobre el extremo C se sintetizaron a partir de la resina BAL-AM-PS cargada con aminas (EMC Microcollections, Tübingen, Alemania).

Los péptidos se purificaron mediante HPLC preparativa en fase inversa. Se utilizaron las siguientes columnas:

- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 µm, 30 x 100 ml, Pieza N.º 186002572 (una columna o dos columnas en serie).
- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 µm, 30 x 150 ml, Pieza N.º 186002797.
- Columna Waters Atlantis Prep OBD T3, 5 µm, 30 x 150 ml, Pieza N.º 186003703.
- Columna Waters XBridge Prep C8 OBD, 5 µm, 30 x 150 ml, Pieza N.º 186003083
- Machery-Nagel Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250 x 40 ml, Pieza N.º 715340,400.

Las fases móviles consistieron en el eluyente A (TFA al 0,1 % en H₂O) y el eluyente B (ACN). Los gradientes se diseñaron basándose en los requerimientos específicos del problema de la separación. Los productos puros se liofilizaron a partir de ACN/H₂O.

Los productos se analizaron mediante HPLC analítica utilizando detección UV a $\lambda = 214$ nm (Columna: Bischoff UHC-640, 53 x 4,0 ml, ProntoSil 120-3-C18-H, 3 µm, Pieza N.º 0604F185PS030). Las fases móviles consistieron en el eluyente A (TFA al 0,07 % en H₂O) y el eluyente B (TFA al 0,1 % en ACN). La caracterización adicional de los productos se hizo mediante UPLC_EM (Columna: Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 ml, Pieza N.º 186002350), utilizando ionización por electronebulización.

Los péptidos que se ejemplifican en la Tabla 4 se sintetizaron utilizando los procedimientos generales que se describen a continuación. Los extremos N o C no sustituidos se indican mediante H- u -OH en cursiva pequeños, respectivamente.

Tabla 4:

Ejemplo	Secuencia	Tipo de Anillo
Ejemplo 8	<i>pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 9	<i>pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 10	<i>pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 11	<i>H-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 12	<i>pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-fenetil-amina</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 13	<i>pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 14	<i>pE-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 15	<i>pE-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 16	<i>H-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁵ -C ¹¹
Ejemplo 17	<i>H-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 18	<i>H-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH</i>	Disulfuro C ⁶ -C ¹²

Ejemplo	Secuencia	Tipo de Anillo
Ejemplo 19	ρ E-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C-fenetil-amina	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 20	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-Aib-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 21	ρ E-R-P-R-L-C-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 22	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Palmitoil)-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 23	ρ E-R-P-R-L-C-K(Palmitoil)-K-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 24	Palmitoil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 25	Lauroil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 26	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroilo)-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 27	ρ E-R-P-R-L-C-K(Lauroilo)-K-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 50	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 51	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-hC-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 52	ρ E-R-P-R-L-hC-H-K-G-P-Nle-hC-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 53	ρ E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 54	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-(D-hC)-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 55	ρ E-R-P-R-L-(D-hC)-H-K-G-P-Nle-(D-hC)-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 56	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-c-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 57	ρ E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-c-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 58	Miristoil-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 59	Miristoil-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 60	Miristoil-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 61	ρ E-R-P-R-L-C-H-K(Miristoil)-G-P-Nle-C-F-OH	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 62	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-NH ₂	Disulfuro C ⁶ -C ¹²
Ejemplo 63	ρ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-NH ₂	Disulfuro C ⁶ -C ¹²

Métodos analíticos

1) HPLC - Método analítico A

- Columna: Bischoff UHC-640 (53 x 4,0 ml) con ProntoSil 120-3-C18-H, 3 μ m; Pieza n.º 0604F185PS030.
- Eluyente A: TFA al 0,07 % en agua/Eluyente B: TFA al 0,1 % en ACN.

- 5
- Flujo: 1,5 ml/minuto.
 - Temperatura: 40 °C.
 - Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,0	90	10
9,5	0	100
12,0	0	100
12,2	90	10

2a) UPLC_EM - Método analítico B

ES 2 670 832 T3

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 ml; Pieza n.º 186002350.
- Eluyente A: TFA al 0,1 % en agua; Eluyente B: TFA al 0,1 % en ACN.
- Flujo: 0,7 ml/minuto.
- Temperatura: 40 °C.

- 5 • Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,0	80	20
1,0	75	25
4,2	10	90
4,3	0	100
4,6	80	20

2b) UPLC_EM - Método analítico C

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 ml; Pieza n.º 186002350.
- Eluyente A: TFA al 0,1 % en agua; Eluyente B: TFA al 0,1 % en ACN.
- Flujo: 0,7 ml/minuto.
- Temperatura: 40 °C.

- 10 • Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,0	99	1
1,0	97	3
3,5	50	50
4,0	10	90
4,3	0	100
4,6	80	20

Los datos analíticos para los péptidos de los Ejemplos 8-27 y 50 a 63 se resumen en la Tabla 5 y se generaron empleando los métodos analíticos descritos anteriormente.

Tabla 5

Péptido	HPLC		Espectrometría de masas				
	t _R [min]	Método	[M+2H] ²⁺ (medido)	[M+3H] ³⁺ (medido)	Método	[M+2H] ²⁺ (calc.)	[M+3H] ³⁺ (calc.)
Ejemplo 8	3,43	A	768,1	512,4	C	768,4	512,6
Ejemplo 9	3,77	A		495,2	C	742,4	495,3
Ejemplo 10	3,74	A	742,5	495,1	C	742,4	495,3
Ejemplo 11	3,61	A	742,9	495,2	C	742,4	495,3
Ejemplo 12	3,62	A		497,8	C	746,4	497,9

Péptido	HPLC		Espectrometría de masas				
	t _R [min]	Método	[M+2H] ²⁺ (medido)	[M+3H] ³⁺ (medido)	Método	[M+2H] ²⁺ (calc.)	[M+3H] ³⁺ (calc.)
Ejemplo 13	3,49	A	768,3	512,5	C	768,4	512,6
Ejemplo 14	4,14	A	808,5	539,2	C	808,4	539,3
Ejemplo 15	3,99	A	773,4	515,8	C	773,4	515,9
Ejemplo 16	3,36	A		475,5	C	712,9	475,6
Ejemplo 17	3,28	A		527,5	C	790,9	527,6
Ejemplo 18	3,36	A		512,5	C	768,4	512,6
Ejemplo 19	4,38	A	756,0	504,2	C	755,9	504,3
Ejemplo 20	3,17	A	782,6	522,0	C	782,4	521,9
Ejemplo 21	3,45	A		512,0	C	767,4	511,9
Ejemplo 22	6,12	A		585,6	B	878,0	585,7
Ejemplo 23	6,46	A	883,2	588,9	B	883,0	589,0
Ejemplo 24	5,20	A		646,0	B	968,6	646,0
Ejemplo 25	5,18	A		627,3	B	940,5	627,3
Ejemplo 26	5,11	A		567,0	B	850,0	567,0
Ejemplo 27	5,44	A		570,0	B	855,0	570,3
Ejemplo 50	2,72	A	694,5		C	694,8	463,6
Ejemplo 51	3,38	A		517,1	C	775,4	517,3
Ejemplo 52	3,45	A		521,9	C	782,4	521,9
Ejemplo 53	3,52	A	768,4	512,5	C	768,4	512,6
Ejemplo 54	3,43	A	775,3	517,1	C	775,4	517,3
Ejemplo 55	3,83	A	782,3	521,8	C	782,4	521,9
Ejemplo 56	3,42	A	768,1	512,4	C	768,4	512,6
Ejemplo 57	3,66	A	768,3	512,4	C	768,4	512,6
Ejemplo 58	5,68	A		685,0	B	1027,1	685,0
Ejemplo 59	5,58	A		733,4	B	1099,6	733,4
Ejemplo 60	5,55	A		781,8	B	1172,1	781,8
Ejemplo 61	3,18	D	874,5	582,9	D	873,5	585,7
Ejemplo 62	3,22	A		512,3	C	767,9	512,3
Ejemplo 63	2,71	A	694,3	463,1	C	694,4	463,2

Procedimientos generales de síntesis

1) Carga del primer aminoácido sobre la resina de cloruro de 2-clorotritilo y remoción de Fmoc

5 Se lavó resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq., 1,0-1,6 mmol/g) minuciosamente con DCM. El aminoácido deseado (normalmente 0,5-2 eq. en relación con la resina, considerando una carga de 1,6 mmol/g) se disolvió en DCM (aproximadamente 10 ml por gramo de resina) y DIPEA (4 eq. en relación con la resina, considerando una carga de 1,6 mmol/g). La solución se añadió a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. La resina se drenó y después se lavó minuciosamente secuencialmente con DCM/MeOH/ DIPEA (17:2:1), DCM, DMA, DCM.

Para la retirada de Fmoc y la determinación de la carga, la resina se agitó repetidamente con piperidina/DMA (1:4) o con 4-metilpiperidina/DMA (1:4) (12 x 10 ml por gramo de la resina inicial) y se lavó con DMA (10 ml, 2 veces por gramo de la resina inicial). Las soluciones combinadas se diluyeron con metanol hasta un volumen V de 250 ml por gramo de la resina inicial. Una alícuota de 2 ml (V_a) de esta solución se diluyó adicionalmente hasta 250 ml (V_t) con metanol. La absorción UV se midió a 299,8 nm contra una referencia de MeOH, dando la absorción A. La resina se lavó minuciosamente secuencialmente con DMA, DCM, DMA, DCM y se secó en un alto vacío a 40 °C, proporcionando m g de resina.

La carga de la resina se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Carga [moles/gramo]} = (A \times V_t \times V) / d \times \epsilon \times V_a \times m$$

(con d: ancho de cubeta; $\epsilon = 7800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2) Síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador Prelude™

2a) Ciclo de síntesis A

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se retiró mediante el tratamiento repetitivo con 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 eq.; solución 0,2 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución 0,3 M en NMP) y DIPEA (3,3 eq.; solución 0,66 M en NMP), seguida de la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante normalmente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, normalmente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA se realizó el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac₂O/piridina/DMA (1:1:8) y la mezcla posterior de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2b) Ciclo de síntesis B

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se retiró mediante el tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 eq.; solución 0,3 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución 0,3 M en NMP) y DIPEA (4,5 eq.; solución 0,9 M en NMP), seguida de la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante normalmente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, normalmente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, se realizó el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac₂O/piridina/DMA (1:1:8) y la mezcla posterior de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2c) Ciclo de síntesis C

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se retiró mediante el tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 eq.; solución 0,3 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución 0,3 M en NMP) y DIPEA (6 eq.; solución 0,9 M en NMP), seguida de la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante normalmente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, normalmente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, se realizó el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac₂O/piridina/DMA (1:1:8) y la mezcla posterior de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2d) Ciclo de síntesis D

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se retiró mediante el tratamiento repetitivo con 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición de una mezcla del Fmoc-aminoácido y Oxima Pura (3 eq. de cada uno; 0,2 M de ambos en NMP) y DIC (3 eq.; solución 0,3 M en NMP), seguida de la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante normalmente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, normalmente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, se realizó el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac₂O/piridina/DMA (1:1:8) y la mezcla posterior de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

3) Disociación de la resina con o sin la retirada concomitante de los grupos protectores

3a) Método de disociación A

5 La resina (0,1 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h con el 95 % de TFA acuoso/EDT/TES (95:2,5:2,5) (3 ml). La solución de disociación se filtró y se añadió solución fresca (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de disociación se filtró. Se añadió solución fresca (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano/dietil éter fríos (1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El resto se lavó con heptano/dietil éter fríos (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío.

10 3b) Método de disociación B

15 La resina (0,1 mmol) se trató con el 95 % de TFA acuoso/EDT (4:1) (0,75 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió una mezcla del 95 % de TFA acuoso (2,18 ml) y TES (75 µl) y se reanudó la agitación a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró después, se añadió a la resina el 95 % de TFA acuoso/EDT/TES (95:2,5:2,5) (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró y se recogió y se añadió solución fresca (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre heptano/dietil éter fríos (1:1) (35 ml). El precipitado formado de esta manera se dejó asentarse, se centrifugó y después el sobrenadante se vertió cuidadosamente. El precipitado se lavó una vez con heptano/dietil éter fríos (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El resto se secó en un alto vacío.

20 3c) Método de disociación C

25 Se añadieron HFIP/DCM (30:70) (5 ml) a la resina (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de disociación se filtró y se recogió y se añadieron HFIP/DCM frescos (30:70) (5 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La solución de disociación se filtró y se recogió. La resina se lavó con DCM (5 ml, 2 veces), que también se recogió. Las soluciones de disociación y lavado combinadas se concentraron a sequedad en alto vacío. El resto se liofilizó a partir de tBuOH/H₂O (1:1).

4) Métodos de ciclación4a) Método de ciclación A (*Formación de disulfuro*)

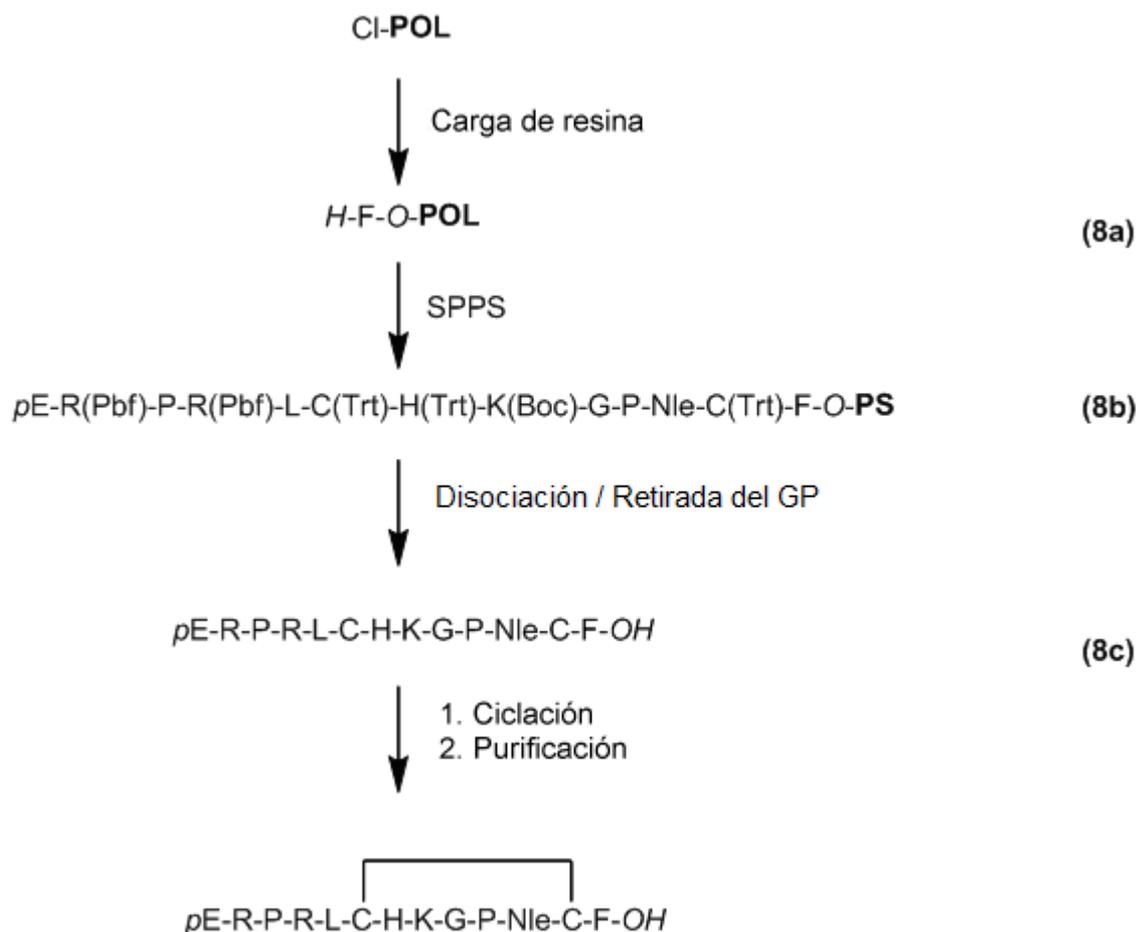
30 El péptido precursor lineal completamente desprotegido se disolvió en H₂O/DMSO (9:1) o (4:1), para proporcionar normalmente una concentración de 1-15 mg/ml. La mezcla de reacción se agitó después a temperatura ambiente durante normalmente 40 h, dependiendo de los requisitos y después se concentró a sequedad en un alto vacío.

4b) Método de ciclación B (*Formación de disulfuro*)

35 El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 eq.) se disolvió en H₂O para proporcionar normalmente una concentración de 10 mg/ml. Se añadió una solución de I₂ 50 mM en AcOH (1,2 eq.) en una porción a la solución agitada y la reacción se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. se añadió ácido ascórbico 0,5 M en H₂O (1,5 eq.) para inactivar el exceso de I₂. La solución se concentró hasta casi sequedad al vacío.

A continuación, se describen las síntesis de ejemplos representativos.

Ejemplo 8 Síntesis de $pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH$ (disulfuro C⁶-C¹²).



Ejemplo 8

- Preparación del **Intermedio 8a**

5 (Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-F-OH, retirada de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

Se lavó resina de cloruro de 2-clorotritilo (40,0 g, 64,0 mmol) con DCM (3 veces). Se añadió una solución de Fmoc-F-OH (24,8 g, 64,0 mmol) en DCM (400 ml) y DIPEA (44,7 ml, 256 mmol) y la suspensión se agitó durante 22 h a temperatura ambiente. La resina se lavó minuciosamente con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3 veces), DCM (3 veces), DMA (3 veces), DCM (3 veces).

10 La resina después se trató cuatro veces durante 10 min con una mezcla de piperidina/DMA (1:4) (400 ml), seguida de lavado con DMA (180 ml, 2 veces). Las soluciones de piperidina/DMA y las soluciones de lavado con DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina. 1 ml de las soluciones combinadas se diluyó hasta 500 ml con metanol y se midió la absorción UV a 299,8 nm como $A = 0,368$. Esto corresponde a una cantidad de Fmoc de 46,2 mmol.

15 La resina se lavó minuciosamente con DCM (3 veces), DMA (3 veces), DCM (3 veces) y se secó al vacío, para proporcionar el **Intermedio 8a** (50,7 g; carga = 0,91 mmol/g).

- Preparación del **Intermedio 8b**

(Ensamblaje del péptido lineal)

El **Intermedio 8a** (2,64 g, 2,40 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó como se indica a continuación:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	C(Trt)	2 x 30 min	D
2	Nle	2 x 15 min	A
3	P	2 x 15 min	A
4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2 x 15 min	A
6	H(Trt)	2 x 15 min	A
7	C(Trt)	2 x 60 min	D
8	L	2 x 15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2 x 15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	pE	2 x 15 min	A

- Preparación del **Intermedio 8c**

(Disociación de la resina con la retirada concomitante del grupo protector)

- 5 El **Intermedio 8b** (2,40 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4 veces). Se añadió una mezcla del 95 % de TFA acuoso/EDT/TES (95:2,5:2,5) (50 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró y se añadió solución de disociación fresca (35 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y después la solución de disociación se filtró. Se añadió solución fresca (35 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla agitada de heptano/dietil éter fríos (1:1) (500 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después el precipitado se dejó asentarse. El sobrenadante se succionó con una frita. El resto se lavó con heptano/dietil éter fríos (1:1) (100 ml, 2 veces) y el sobrenadante se succionó con una frita. El sólido se secó en un alto vacío, para proporcionar el intermedio 8c en forma de un sólido de color grisáceo (3,75 g, 1,88 mmol).

- Preparación del **Ejemplo 8**

(Ciclación y purificación)

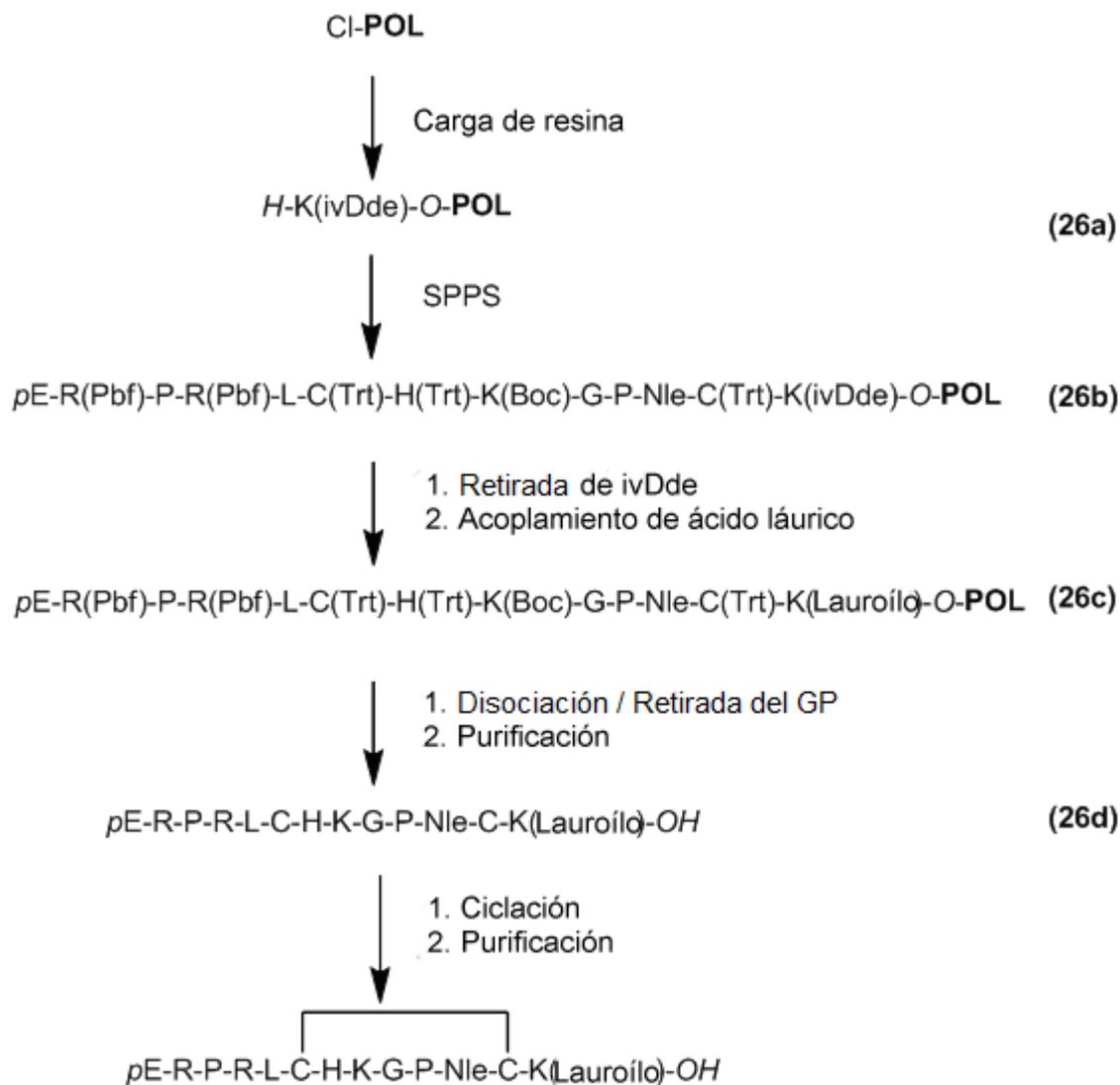
- 20 El **Intermedio 8c** (3,75 g, 1,88 mmol) se disolvió en H₂O (375 ml). Se añadió una solución de I₂ 50 mM en AcOH (45,1 ml, 2,26 mmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico 0,5 M en H₂O (5,64 ml, 2,82 mmol), para inactivar el exceso de I₂. La solución se concentró hasta casi sequedad. La reacción se realizó en dos porciones: escala de 0,188 mmol y escala de 1,69 mmol. Los productos en bruto se combinaron para la purificación. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H₂O, para proporcionar el Ejemplo 8, en forma de un sólido de color blanco (1,53 g, 0,767 mmol).

- 25 El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico C: t_R = 3,43 min) y UPLC_EM (Método analítico B; medido: [M+3]³⁺ = 512,4; calculado: [M+3]³⁺ = 512,6).

- 30 Como alternativa, el polipéptido en bruto del Ejemplo 8 se disolvió en agua (500 ml de agua/mmol de polipéptido) y se convirtió en la sal de acetato con la ayuda de una resina de intercambio iónico (es decir, Amberlite IRA-67 (forma de acetato) (200 g/mmol de polipéptido) y se purificó mediante HPLC preparativa (C8 gel de sílice en fase inversa modificada de Daisogel, gradiente: ACN/H₂O: 3 % de ACN y 97 % de [mezcla de ácido acético al 0,3 %/agua] hasta el 12 % de ACN y 88 % de [mezcla de ácido acético al 0,3 %/agua]) y se liofilizó, para proporcionar una sal de acetato del Ejemplo 8 en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 60 al 100 %).

La estequiometría de la sal se evaluó basándose en el análisis del contenido de ácido acético (cromatografía de iones) y el contenido de agua y se determinó que variaba entre 1:3 y 1:4 (polipéptido: acetato).

Ejemplo 26 Síntesis de $pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroilo)-OH$ (disulfuro C⁶-C¹²)



Ejemplo 26

- Preparación del **Intermedio 26a**

5 (Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-K(ivDde)-OH, retirada de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

La resina de cloruro de 2-clorotritilo (1,00 g, 1,60 mmol) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-K(ivDde)-OH (1,84 g, 3,20 mmol) en DCM (10 ml) y DIPEA (1,12 ml, 6,40 mmol), análogamente al procedimiento general descrito anteriormente, para proporcionar el Intermedio 26a (1,39 g; carga = 0,75 mmol/g).

- Preparación del **Intermedio 26b**

10 (Ensamblaje del péptido lineal)

El **Intermedio 26a** (134 mg, 0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó como se indica a continuación:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	C(Trt)	2 x 30 min	B
2	Nle	2 x 30 min	B
3	P	2 x 30 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(Boc)	2 x 30 min	B
6	H(Trt)	2 x 30 min	B
7	C(Trt)	2 x 30 min	B
8	L	2 x 30 min	B
9	R(Pbf)	4 x 1 h	B
10	P	2 x 90 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	ρ E	2 x 90 min	B

- Preparación del **Intermedio 26c**

(Retirada de ivDde y acoplamiento de ácido láurico)

- 5 El **Intermedio 26b** (0,100 mmol) se lavó con THF (3 veces). Se añadió una solución de monohidrato de hidrazina (0,245 ml, 5,00 mmol) en THF (12 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se filtró. Este paso se hizo dos veces más. La resina se lavó con DMA (3 veces), DCM (3 veces), DMA (2 veces), DCM (5 veces) y DMA (3 veces). Se disolvieron ácido láurico (100 mg, 0,500 mmol) y HCTU (207 mg, 0,500 mmol) en NMP (3 ml) y DIPEA (0,087 ml, 0,500 mmol). Después de 5 min de activación, la solución se añadió a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó con DMA (3 veces), DCM (3 veces), DMA (3 veces), DCM (5 veces), para proporcionar el intermedio 26c.

- Preparación del **Intermedio 26d**

(Disociación de la resina con la retirada concomitante del grupo protector y después la purificación)

- 15 Una mezcla del 95 % de TFA acuoso/EDT/TES (95:2,5:2,5) (3 ml), se añadió al intermedio 26c (0,100 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de disociación se filtró y se añadió solución de disociación fresca (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de disociación se filtró. Se añadió solución fresca (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano/dietil éter fríos (1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El resto se lavó con heptano/dietil éter fríos (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío.

El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O, para proporcionar el **intermedio 26d** en forma de un sólido de color blanco (74,1 mg, 0,034 mmol).

- Preparación del **Ejemplo 26**

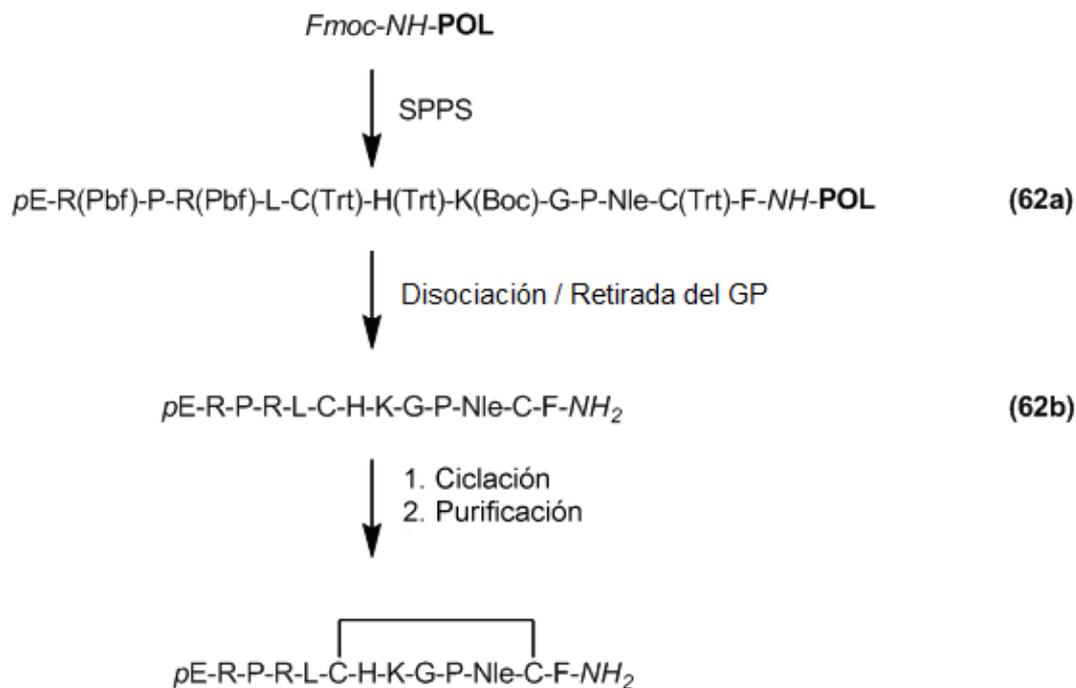
- 25 (Ciclación y purificación)

El **Intermedio 2d** (74,1 mg, 0,034 mmol) se disolvió en H₂O/DMSO (9:1) (74 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 h; después se concentró a sequedad al vacío. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O, para proporcionar el **Ejemplo 26** en forma de un sólido de color blanco (60,0 mg; 0,028 mmol).

- 30

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico A: $t_R = 5,11$ min) y UPLC_EM (Método analítico B; medido: $[M+3]^{3+} = 567,0$; calculado: $[M+3]^{3+} = 567,0$).

Ejemplo 62 Síntesis de $\rho E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-NH_2$ (disulfuro C⁶-C¹²)



Ejemplo 62

5 • Preparación del **Intermedio 62a**

(Ensamblaje del péptido lineal)

La resina de Rink-Amida-AM-PS protegida por Fmoc (217 mg, 0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó como se indica a continuación:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	F	2 x 15 min	A
2	C(Trt)	2 x 30 min	D
3	Nle	2 x 15 min	A
4	P	2 x 15 min	A
5	G	2 x 30 min	A
6	K(Boc)	2 x 15 min	A
7	H(Trt)	2 x 15 min	A
8	C(Trt)	2 x 1 h	D
9	L	2 x 15 min	A
10	R(Pbf)	4 x 1 h	A
11	P	2 x 15 min	A
12	R(Pbf)	4 x 1 h	A
13	ρE	2 x 15 min	A

- Preparación del **Intermedio 62b**

(Disociación de la resina con la retirada concomitante del grupo protector)

Una mezcla del 95 % de TFA acuoso/EDT/TES (95:2,5:2,5) (3 ml) se añadió al **intermedio 62a** (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de disociación se filtró y se añadió solución de disociación fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min y después la solución de disociación se filtró. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano/dietil éter fríos (1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El resto se lavó con heptano/dietil éter fríos (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío. El producto en bruto del Intermedio 62b se utilizó en el siguiente paso sin purificación.

- Preparación del **Ejemplo 62**

(Ciclación y purificación)

El **Intermedio 62b** (0,100 mmol) se disolvió en H₂O (20 ml). Se añadió una solución de I₂ 50 mM en AcOH (2,4 ml, 0,120 mmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico 0,5 M en H₂O (0,30 ml, 0,300 mmol), para inactivar el exceso de I₂. La solución se concentró a casi sequedad. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O, para proporcionar el **Ejemplo 62**, en forma de un sólido de color blanco (50,5 mg, 0,025 mmol).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico C: t_R = 3,22 min) y UPLC_EM (Método analítico C; medido: [M+3]³⁺ = 512,3; calculado: [M+3]³⁺ = 512,3).

Los otros ejemplos se sintetizaron análogamente:

- Los **Ejemplos 9 a 25 y 27** se sintetizaron análogamente al **Ejemplo 26**.
- Los **Ejemplos 50 a 61** se sintetizaron análogamente al **Ejemplo 8**.
- Los **Ejemplos 63** se sintetizaron análogamente al **Ejemplo 62**.

Los polipéptidos de los Ejemplos 8-27 y 50-63 se pueden purificar y aislar como se ha descrito anteriormente y/o mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos y recristalización. Cuando el polipéptido aislado en los ejemplos anteriores es un compuesto libre, se puede convertir en una sal adecuada mediante el método conocido. Por tanto, los péptidos de los Ejemplos 8-27 y 50-63 se pueden convertir en su sal correspondiente (por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, citrato, acetato, lactato u otra sal farmacéutica adecuada para inyección) con una relación de polipéptido:sal que varía de 1:1 a 1:4. Por ejemplo, los polipéptidos de los Ejemplos 8-27 y 50-63 se pueden disolver en agua y se pueden convertir en una sal utilizando resinas de intercambio iónico. Por el contrario, cuando el péptido aislado es una sal, se puede convertir en el péptido libre mediante un método conocido, o directamente en una sal diferente con la ayuda de resinas de intercambio iónico.

Se ha encontrado que los polipéptidos de los ejemplos a continuación tienen valores CE₅₀ en el intervalo de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1100 nM para la potencia del receptor APJ. Se ha encontrado que los polipéptidos de los ejemplos a continuación tienen una estabilidad en plasma mayor de 2 minutos, mayor de 5 minutos, mayor de 10 minutos, mayor de 20 minutos, mayor de 50 minutos y mayor de 60 minutos.

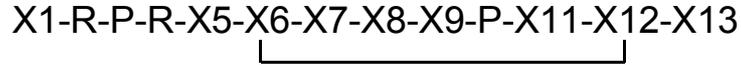
Se puede ver que los polipéptidos de la invención son útiles como agonistas del receptor APJ y, por tanto, son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones que responden a la activación del receptor APJ, tales como las enfermedades que se desvelan en el presente documento.

Habiendo descrito de esta manera las realizaciones de ejemplo de la presente invención, debe señalarse por los expertos habituales en la materia que las divulgaciones de la presente son solamente de ejemplo y que se pueden hacer otras diversas alternativas, adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. En consecuencia, la presente invención no se limita a las realizaciones específicas como se ilustran en la misma.

45

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene la siguiente fórmula II:



II

X1 está ausente o es pE, R, Q o Isn;

5 X5 es L o Cha;

X7 es H, Aib, F, K (Lauroílo) o K (Palmitoílo);

X8 es K, F o 4-amino-Isn;

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

10 X13 está ausente o es F, f, K (Lauroílo), K (Palmitoílo);

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado entre C, c, hC, D-hC, en los que las cadenas laterales de X6 y X12 están unidas entre sí a través de un enlace covalente formando un disulfuro; y en la que el extremo N y el extremo C forman opcionalmente un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; en la que

15 Nle es L-norleucina; D-hC es D-homocisteína;

hC es L-homocisteína;

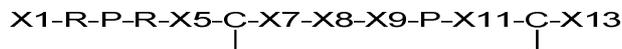
Aib es el ácido α -aminoisobutírico;

Cha es (S)- β -ciclohexilalanina;

Isn es isonipecotinoílo; y

20 pE es ácido L-piroglutámico.

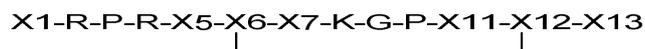
2. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la Fórmula III:



III;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la Fórmula IV:

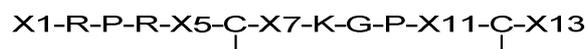


25

IV;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

4. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la Fórmula V:



V;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

5. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que X1 es pE; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

5 6. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que X13 es F; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

7. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que X5 es L; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

8. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que X7 es H; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

10 9. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que X11 es Nle, o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre:

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

15 *pE-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH,*

H-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-Fenetilamina,*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-f-OH,*

pE-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C*-F-OH,*

20 *pE-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

H-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

H-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

H-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C*- Fenetilamina,*

25 *pE-R-P-R-L-C*-H-K-Aib-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-K(Palmitoílo)-OH,*

pE-R-P-R-L-C-K(Palmitoílo)-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

Palmitoílo-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

30 *Lauroílo-O2Oc-Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-K(Lauroílo)-OH,*

pE-R-P-R-L-C-K(Lauroílo)-K-G-P-Nle-C*-F-OH,*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-NH₂;*

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-NH₂*;

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-OH*;

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-hC*-F-OH*;

pE-R-P-R-L-hC-H-K-G-P-Nle-hC*-F-OH*;

5 *pE-R-P-R-L-c*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*;

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-(D-hC)*-F-OH*;

pE-R-P-R-L-(D-hC)-H-K-G-P-Nle-(D-hC)*-F-OH*;

MiristoíloO₂OcO₂OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-OH;

MiristoíloO₂OcO₂OcO₂OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-OH;

10 MiristoíloO₂OcO₂OcO₂OcO₂OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C-f-OH;

*pE-R-P-R-L-C*H-K-G-P-Nle-c*-F-OH*;

pE-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-c*-F-OH*; y

pE-R-P-R-L-C-H-K(Myr)-G-P-Nle-C*-F-OH*.

15 en los que los dos aminoácidos marcados con “*” representan los aminoácidos que forman un disulfuro a través de su cadena lateral; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

11. El polipéptido de la reivindicación 10 seleccionado entre:

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*,

pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-OH*,

pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH*,

20 *H-Isn-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH*,

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-Fenetilamina*,

pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-f-OH*,

pE-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C*-F-OH*,

pE-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C*-F-OH*,

25 *H-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*,

H-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*,

H-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, y

pE-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C*-Fenetilamina*; en los que las cadenas laterales de los 2 aminoácidos cisteína C* forman juntas un enlace disulfuro; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

30 12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 11 que es *pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*; en el que las cadenas laterales de los 2 aminoácidos cisteína C* forman juntos un enlace disulfuro; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

13. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12 o una sal del polipéptido.

14. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12 en forma de sal de acetato.
15. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso como un medicamento.
16. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno que responde al agonismo del receptor APJ.
- 5 17. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICDA), la insuficiencia cardíaca crónica, la hipertensión pulmonar, la fibrilación auricular, el síndrome de Brugada, la taquicardia ventricular, la aterosclerosis, la hipertensión, la reestenosis, las enfermedades isquémicas cardiovasculares, la cardiomiopatía, la fibrosis cardíaca, la arritmia, la retención de agua, la diabetes (incluyendo la diabetes gestacional), la obesidad, la arteriopatía periférica, los
10 accidentes cerebrovasculares, los ataques isquémicos transitorios, los traumatismos craneoencefálicos, la esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo la quemadura solar) o la preeclampsia.
18. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y uno o más coagentes terapéuticamente activos.
- 15 19. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 18 en la que el coagente se selecciona entre inótrpos, bloqueantes de los receptores beta adrenérgicos, inhibidores de la HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueantes del canal de calcio (BCC), antagonistas de la endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueantes de los receptores de aldosterona, bloqueantes de los
20 receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (IAS), un inhibidor de CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y/o un inhibidor de NEP.
20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.