

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 323**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2013 PCT/US2013/070742**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2013 E 13811648 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2922559**

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

30 Prioridad:

**20.11.2012 US 201261728395 P**

**14.03.2013 US 201361781397 P**

**25.07.2013 US 201361858251 P**

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

**22.03.2019**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ZECRI, FRÉDÉRIC;**

**YASOSHIMA, KAYO;**

**GROSCHE, PHILIPP;**

**YUAN, JUN y**

**ZHAO, HONGJUAN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 705 323 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 de apelina lineales sintéticos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

## 5 Campo de la invención

10 La invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden secuencias modificadas de péptidos y polipéptidos diseñadas para tratar enfermedades cardiovasculares en sujetos a los que se administran, y que muestran una mayor resistencia a la degradación y una bioactividad equivalente o mayor que sus contrapartes de tipo salvaje. La invención también se refiere a métodos para preparar dichas composiciones y usar dichas composiciones como agentes farmacéuticamente activos para tratar enfermedades cardiovasculares. El objeto de la invención se define por las reivindicaciones.

## 15 Antecedentes de la invención

20 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 tanto, el gasto cardíaco, es decir, el volumen efectivo de sangre expulsado por cualquier ventrículo del corazón a lo largo del tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, insuficiencia cardíaca para mantener una circulación sanguínea adecuada, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más. Hay aproximadamente 500K hospitalizaciones por año por "insuficiencia cardíaca aguda descompensada" (ADHF) sólo en los EE. UU.

25 Las terapias actuales para la ADHF incluyen diuréticos, vasodilatadores e inótropos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) se usan en el contexto agudo, a pesar de su asociación con eventos adversos como arritmia y aumento de la mortalidad a largo plazo. Estas responsabilidades han impedido su aplicación en la insuficiencia cardíaca crónica. La digoxina es un inótropo oral, pero está limitada por un índice terapéutico estrecho, un aumento del potencial arritmogénico y una contraindicación en la insuficiencia renal.

30 Una terapia para la insuficiencia cardíaca que aumenta la contractilidad cardíaca sin responsabilidades arritmogénicas o de mortalidad es urgente para la ADHF, pero también podría abordar la enorme necesidad médica no satisfecha en la insuficiencia cardíaca crónica.

35 La apelina es el ligando endógeno para el receptor acoplado a proteína G (GPCR) previamente huérfano, APJ, también denominado receptor de apelina, receptor tipo angiotensina 1, receptor tipo II de angiotensina, y similares. La vía de apelina/APJ se expresa ampliamente en el sistema cardiovascular y la apelina ha mostrado efectos cardiovasculares beneficiosos importantes en modelos preclínicos. La administración aguda de apelina en humanos causa vasodilatación coronaria y periférica y aumenta el gasto cardíaco (Circulation. 2010; 121:1818–1827). Como resultado, el agonismo de la APJ se está convirtiendo en un objetivo terapéutico importante para los pacientes con insuficiencia cardíaca. Se cree que la activación del receptor de apelina APJ aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona protección cardíaca, sin las responsabilidades de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben una vida media y una duración de la acción in vivo muy cortas. La vida media muy corta es una dificultad mayor reconocida con el suministro de tales péptidos endógenos terapéuticos debido a la rápida eliminación del suero y la degradación proteolítica a través de la acción de las peptidasas.

40 Una forma que se ha usado actualmente para superar esta desventaja es administrar una gran dosis de péptido terapéutico de interés para el paciente, de modo que incluso si un péptido terapéutico está degradado, queda suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Sin embargo, este método es incómodo para los pacientes. Dado que la mayoría de los péptidos terapéuticos no se pueden administrar por vía oral, el péptido terapéutico tendría que ser infundido constantemente, infundido con frecuencia por inyección intravenosa o administrado frecuentemente por la vía inconveniente de las inyecciones subcutáneas. La necesidad de una administración frecuente también resulta en muchas terapias peptídicas potenciales que tienen un alto costo de tratamiento proyectado inaceptable. La presencia de grandes cantidades de péptido degradado también puede generar efectos secundarios no deseados.

55 La incomodidad en la administración y los altos costos son dos razones por las cuales la mayoría de los péptidos terapéuticos con perfiles de bioactividad atractivos pueden no desarrollarse como candidatos a fármacos

60 Por lo tanto, un enfoque para prolongar la vida media de los péptidos es modificar los péptidos terapéuticos de tal manera que su degradación se desacelere mientras se mantiene la actividad biológica.

65 Por lo tanto, es deseable identificar los péptidos y polipéptidos que imitan la función de la apelina, pero que tienen una vida media aumentada y demuestran una bioactividad equivalente o mayor que la apelina de origen natural. Además, es deseable identificar los péptidos y polipéptidos análogos de la apelina que exhiben restricciones conformacionales aumentadas, es decir, la capacidad de lograr y mantener un estado conformacional activo de manera que los péptidos y polipéptidos puedan interactuar con sus receptores y/u otras dianas de ruta sin la

necesidad de plegado adicional o reposicionamiento. Los enfoques adicionales incluyen la reducción de la velocidad de depuración mediante la conjugación de los péptidos con moléculas que impiden su eliminación a través del riñón.

5 Por lo tanto, existe una necesidad de péptidos terapéuticos modificados con vida media aumentada para proporcionar una duración más prolongada de la acción in vivo, al tiempo que se mantiene una baja toxicidad pero que retiene las ventajas terapéuticas de los péptidos modificados.

10 Murza et al., Chem. Medicina. Chem. 7, No. 2, 2012, 318–325 describen péptidos miméticos de la apelina. El documento WO 2010/053545 A2 se refiere a moduladores alostéricos del receptor de APJ. Sidorova et al., Russian J. Bioorg. Chem. 38, No. 1, 2012, 40–51 y Kleinz et al., Pharmacology & Therapeutics 107, No. 2, 2005, 198–211, describen las propiedades cardioprotectoras de la apelina-12 y ciertos análogos.

Compendio de la invención

15 La presente invención está dirigida a superar el problema de la degradación de péptidos en el cuerpo modificando el péptido o polipéptido terapéutico de interés, es decir, los agonistas de APJ.

20 El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos péptidos y polipéptidos, o bioconjugados de ellos, que sean útiles como agonistas de APJ, y que también posean al menos una de las siguientes mejoras sobre la apelina de tipo salvaje y otros análogos de apelina conocidos: mayor vida media; mayor inmunidad a la degradación en la administración y/o en la solubilización; y mayores restricciones conformacionales, al mismo tiempo que exhiben la misma o mayor actividad biológica que la apelina de tipo salvaje. Los péptidos y polipéptidos de esta invención o su bioconjugado son, por lo tanto, particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca, trastornos y afecciones asociados con insuficiencia cardíaca y trastornos y afecciones que responden a la activación de la actividad del receptor de APJ.

25 En una realización, los péptidos y polipéptidos de la invención, o bioconjugados de ellos, como se definen en las reivindicaciones, son en particular para usar en el tratamiento o la prevención de un trastorno sensible a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor de APJ, a saber, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

30 La invención se refiere a los péptidos y polipéptidos, o bioconjugados de ellos, como se define en las reivindicaciones, y a las composiciones farmacéuticas que los comprenden, y, con fines de referencia, la divulgación describe métodos de fabricación y su uso, como se describe en la presente. En lo que respecta a las reivindicaciones, los ejemplos de péptidos y polipéptidos de la invención incluyen los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster, una de sus sales, y su bioconjugado, así como cualesquiera péptidos o polipéptidos enumerados específicamente en este documento, y sus bioconjugados, incluidos, entre otros, los ejemplos experimentales.

35 La presente divulgación, con fines de referencia, proporciona un péptido o una fórmula polipeptídica (I) (SEQ ID NO: 1):

X1–X2–X3–R–X5–X6–X7–X8–X9–X10–X11–X12–X13 I

50 en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente, Q, A o pE;

55 X2 es R o r;

X3 es P o 4–PhP;

X5 es L, Cha, D–L, F, Y, Y(Bzl), 3,4–Cl2–F o Nal;

60 X6 es un D–aminoácido, S o A;

X7 es un D–aminoácido, L, H o Aib; y al menos uno de X6 y X7 es D–aminoácido o Aib;

65 X8 es K, k, Q o E;

X9 es G o D;

- X10 es P o ácido piperídico;
- 5 X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;
- X12 está ausente, es P o un D-aminoácido;
- 10 X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido;
- en donde:
- Nle es L-norleucina;
- 15 D-Nle es D-norleucina;
- Nal es L-(naftil)alanina;
- 20 D-Nva es D-norvalina;
- Aib es ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico;
- Cha es (S)-p-ciclohexilalanina;
- 25 D-Tic es ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico;
- pE es ácido L-piroglutámico;
- 30 3,4-Cl<sub>2</sub>-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina;
- Y es L-tirosina; e Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;
- o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente.
- 35 Como se explica adicionalmente en la presente, las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en la técnica se usan para representar residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por "D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, se refiere al L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, se refiere al D-aminoácido.
- 40 Sólo con fines de referencia, cualquiera de los residuos de aminoácidos de la fórmula I enumerados anteriormente, o sus fórmulas relacionadas descritas en la presente, por ejemplo, las fórmulas I a IV, pueden sustituirse de manera conservadora, siempre que el péptido o polipéptido de la invención aún se mantenga actividad funcional y las propiedades estructurales (por ejemplo, prolongación de la vida media, protección contra la degradación, restricción conformacional). El principio y los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas permisibles se explican con más detalle en este documento.
- 45 La divulgación, con fines de referencia, proporciona además un bioconjugado o un multímero de él, que comprende:
- 50 a. un péptido o un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV,
- b. un resto que prolonga la vida media;
- 55 en el que dicho péptido o polipéptido y dicha vida media están unidos en forma covalente, opcionalmente a través de un ligador. En lo que respecta a las reivindicaciones, los bioconjugados o multímeros de ellos forman parte de la invención.
- 60 El resto de prolongación de la vida media de la invención puede estar unido covalentemente, ligado o conjugado a un péptido o análogo de polipéptido. Un resto de prolongación de la vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo colesterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido natural o sintético que se una a un receptor de rescate. Preferiblemente, el resto que prolonga la vida media está unido en forma covalente, opcionalmente a través de un ligador, a la proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con vidas medias séricas largas. Por ejemplo, el resto de prolongación de la vida media es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA) o polipéptidos de unión a albúmina. Preferiblemente, la porción de resto de vida media del bioconjugado es una albúmina sérica humana.
- 65

- 5 El resto de prolongación de la vida media está unido de tal manera que mejora y/o no interfiere con la función biológica de las porciones constituyentes de los bioconjugados de la invención, por ejemplo, el péptido o polipéptido de la fórmula I o sus fórmulas relacionadas descritas en la presente (fórmulas I–IV). El resto de prolongación de la vida media puede ser una proteína tal como un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA) o polipéptidos de unión a albúmina. Tales proteínas descritas en este documento también pueden formar multímeros.
- 10 En algunas realizaciones, el resto que extiende la vida media está unido covalentemente al término N del péptido o polipéptido de una cualquiera de las fórmulas I–IV. En otras realizaciones, el resto que extiende la vida media está unido covalentemente al término C del péptido o polipéptido de una cualquiera de las fórmulas I a IV de la invención.
- 15 Los polipéptidos de la invención o su bioconjugado, a través de la activación del receptor de APJ, tienen utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (quemaduras de sol) y preeclampsia.
- 20 En una realización preferida, los polipéptidos de la invención, o sus bioconjugados, son útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF).
- 25 En otra realización, la presente divulgación, con fines de referencia, se refiere a un método para tratar un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor de APJ, en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster, una sal o sus bioconjugados, de manera que se trate el trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor de APJ en el sujeto.
- 30 En otra realización más, la divulgación y, en la medida en que la realización entre en las reivindicaciones, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o sal de la misma, o un bioconjugado de él, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 35 En otra realización más, la divulgación y, en la medida en que la realización entre en las reivindicaciones, la invención se refiere a combinaciones que incluyen un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster, una sal o un bioconjugado de él, y combinaciones farmacéuticas de uno o más agentes terapéuticamente activos.
- 40 En otra realización, la divulgación, con fines de referencia, se refiere a un método para la activación del receptor de APJ en un sujeto que lo necesita, que comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster, una sal o un bioconjugado de él.
- 45 Descripción detallada de la invención
- Para los propósitos de interpretar esta memoria descriptiva, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se especifique lo contrario y cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural, y viceversa.
- 50 Como se usa en la presente, “trastornos o enfermedades que responden a la modulación del receptor de APJ”, “trastornos y afecciones que responden a la modulación de APJ”, “trastornos y afecciones que responden a la modulación de la actividad del receptor de APJ”, “trastornos que responden a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor de APJ”, y expresiones similares incluyen insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluida la quemadura solar) y preeclampsia.
- 55 Como se usa en la presente, “activación de la actividad del receptor de APJ” o “activación del receptor de APJ”, se refiere a un aumento en la actividad del receptor de APJ. La activación de la actividad del receptor de APJ también se denomina “agonismo” del receptor de APJ, por ejemplo, mediante la administración de los péptidos y polipéptidos de la invención.
- 60 Como se usa en la presente, los términos “polipéptido” y “péptido” se usan de manera indistinta para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Excepto por las abreviaturas para los aminoácidos poco comunes o no naturales

5 que se muestran en la Tabla 1 a continuación, las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en la técnica se usan para representar residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por "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. Grupos o cadenas o abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar los péptidos. Los péptidos se indican con el término N a la izquierda y la secuencia se escribe desde el término N al extremo C.

10 Los péptidos de la invención como se definen en las reivindicaciones, y también los péptidos fuera de las reivindicaciones que se describen sólo con fines de referencia, contienen aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no aparecen en la naturaleza) y otros análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica se puede emplear alternativamente.

15 Ciertos aminoácidos no naturales pueden introducirse mediante la tecnología descrita en Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang and 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 U. S. N.º 7.083.970. Brevemente, algunos de estos sistemas de expresión implican mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón sin sentido, como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Dichos vectores de expresión se introducen luego en un huésped que puede utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y cargado con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales particulares que son beneficiosos para el propósito de conjugar restos con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con cadenas laterales de acetileno y azido.

25 Uno o más de los aminoácidos naturales o no naturales en un péptido de la divulgación o (según lo definido por las reivindicaciones) la invención pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un ligador para conjugación, funcionalización u otra modificación, etc. Dichas modificaciones pueden realizarse 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 exhibe una mayor vida media in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la incorporación de D-aminoácidos adicionales, etc. Ninguna de las modificaciones debería interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido, pero tales modificaciones pueden conferir propiedades deseables, por ejemplo, una actividad biológica mejorada, sobre el péptido.

30 Dichas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de la divulgación o, en la medida en que estén cubiertas por las reivindicaciones, de la invención en relación con las proteínas de tipo salvaje, así como, en algunos casos, que sirven como puntos de unión para, por ejemplo, marca y agentes de prolongación de la vida media de proteínas, y con el propósito de fijar dichas variantes a la superficie de un soporte sólido.

35 En ciertas realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas del sitio, se usan para unir conjugados, por ejemplo, grupos PEG a polipéptidos y/o péptidos de la invención, con el fin de prolongar, por ejemplo, la vida media o mejorar de otro modo las propiedades biológicas de dichos polipéptidos y/o péptidos. Dichas técnicas se describen adicionalmente en la presente.

40 En otras realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas del sitio, se utilizan para unir otros polímeros y moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que extienden la vida media del polipéptido de la invención. Una de tales realizaciones incluye la unión de ácidos grasos o compuestos de unión a albúmina específicos a polipéptidos y/o péptidos. En otras realizaciones, las modificaciones se realizan en un tipo particular de aminoácido y pueden unirse en uno o más sitios en los polipéptidos.

45 En otras realizaciones, dichas modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas del sitio, se usan como medios de unión para la producción de multímeros de tipo salvaje y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetrámeros. Estas moléculas de proteínas multiméricas pueden tener además grupos como PEG, azúcares y/o conjugados de PEG-colesterol unidos o fusionados de forma amino-terminal o carboxi-terminal a otras proteínas como Fc, albúmina de suero humano (HSA), etc.

50 En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas del sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos en los que la posición del sitio incorpora específicamente pirrolisina o análogo de la pirrolisina o aminoácidos que no se producen de forma natural (para-acetil-Phe, para-azido-Phe) permite la orientación controlada y la unión de tales proteínas, polipéptidos y/o péptidos en una superficie de un soporte sólido o tener grupos como PEG, azúcares y/o conjugados de PEG-colesterol unidos.

55 En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas de sitio se usan para unir específicamente sitios de proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando así hetero-oligómeros que incluyen, pero sin limitación, heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, dichas modificaciones específicas del sitio se usan para unir específicamente proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando así 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 más de un tipo de molécula se una en un sitio único de una proteína, polipéptido o péptido.

5 En otras realizaciones, las modificaciones enumeradas en la presente pueden realizarse de una manera no específica del sitio y dar lugar a 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 como se reivindica.

10 En algunas realizaciones, la presente divulgación (con fines de referencia) o la invención según se reivindica proporcionan complejos que comprenden al menos un péptido o polipéptido de cualquiera de las fórmulas I-IV unidos a un anticuerpo, tal como un anticuerpo por el que se une específicamente a un péptido o polipéptido como se describe en la presente.

15 Sólo con fines de divulgación, o en la medida en que entren en las reivindicaciones como realización de la invención, un experto en la técnica apreciará que pueden realizarse diversas sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos, en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos. Se describe en la presente, sin disminuir necesariamente su actividad. Como se usa en la presente, "aminoácido comúnmente usado como un sustituto del mismo incluye sustituciones conservativas (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). Para los fines de la sustitución conservativa, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares (hidrófilos), neutros incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen sustituir un L-aminoácido por su correspondiente D-aminoácido, sustituir cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene tiol, sustituir una lisina por homolisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene amino, o que sustituyen una alanina por norvalina, o similares.

30 El término "aminoácido", como se usa en la presente, se refiere a aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite tales formas estereoisoméricas. Los aminoácidos se mencionan aquí ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

35 El término "natural" se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. De manera similar, "de origen no natural", "no natural" y similares, como se usan en la presente, se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado o sintetizado estructuralmente por el hombre. Cuando se usa en relación con los aminoácidos, el término "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)).

45 Las expresiones "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se usan en la presente, están destinadas indistintamente a representar estructuras de aminoácidos que no pueden generarse biosintéticamente en ningún organismo utilizando genes no modificados o modificados de cualquier organismo, ya sean iguales o diferentes. Las expresiones se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia de proteína apelina de origen natural o en las secuencias de la presente invención. Estos incluyen, pero sin limitación, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos naturales, selenocisteína, pirrolisina (Pyl) o pirrolina-carboxi-lisina (Pcl, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente PCT WO 2010/48582). Dichos residuos de aminoácidos no naturales pueden introducirse mediante la sustitución de aminoácidos de origen natural y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de la proteína apelina de origen natural o las secuencias de la invención. El residuo de aminoácido no natural también puede incorporarse de manera que se imparte una funcionalidad deseada a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad de ligar un resto funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se usa en relación con los aminoácidos, el símbolo "U" significará "aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se usa en la presente.

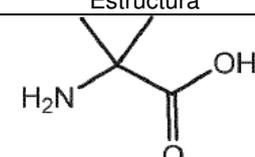
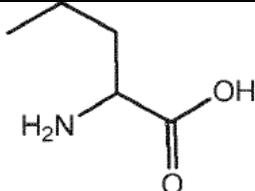
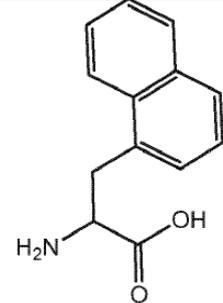
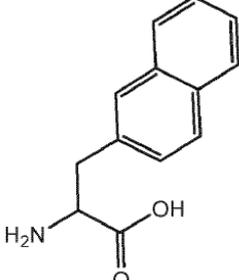
60 Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa (ARN) modificada para su incorporación en una proteína. Estos pares de ARNt/RS ortogonales "seleccionados" se generan mediante un proceso de selección desarrollado por Schultz et al. o por mutación aleatoria o dirigida. A modo de ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un "aminoácido natural", ya que se genera biosintéticamente por los genes transferidos de un organismo a las células huésped y se incorpora a las proteínas mediante el uso de los genes naturales de ARNt y ARNt sintetasa, mientras que la p-aminofenilalanina (ver, 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. 2003 Jan 29;125(4):935-9) es un "aminoácido innatural" porque, aunque se genera biosintéticamente, se incorpora en las proteínas mediante un par de ARNt/ARNt sintetasa ortogonal "seleccionado".

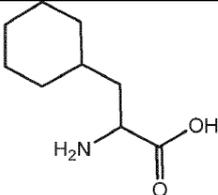
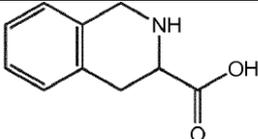
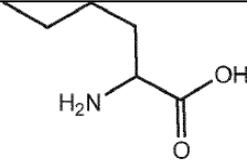
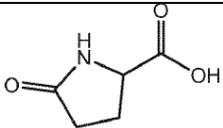
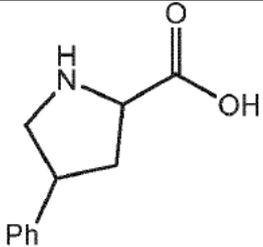
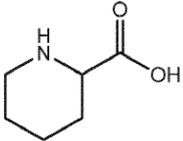
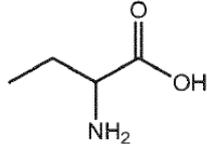
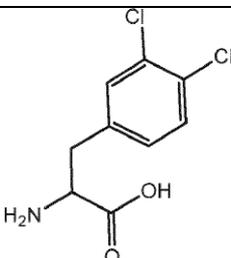
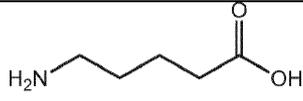
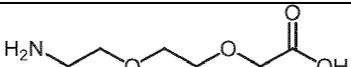
5 Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero sin limitación, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilaspargina, homoprolina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpantilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipercolico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye aminoácidos naturales que son metabolitos en ciertos organismos pero que no están codificados por el código genético para la incorporación a las proteínas. Tales aminoácidos incluyen, pero sin limitación, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

15 La expresión "análogo de aminoácido", como se usa en la presente, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, solo a modo de ejemplo, un carbono  $\alpha$  que está unido 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 están bloqueados químicamente, de manera reversible o irreversible, o que su grupo carboxi C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral están modificados químicamente. Tales análogos incluyen, pero sin limitación, sulfóxido de metionina, sulfona de metionina, S-(carboximetil)cisteína, sulfóxido de S-(carboximetil)cisteína, sulfona de S-(carboximetil)cisteína, (beta-metil éster) de ácido aspártico, N-etilglicina, alanina carboxamida, homoserina, norleucina y metilsulfonio de metionina.

20

Tabla 1: aminoácidos innaturales o no naturales como se describe en la invención:

Símbolo	Nombre	Estructura
Aib	ácido $\alpha$ -aminoisobutírico	
Nva o nva (D-Nva)	L-Norvalina o D-Norvalina	
1-Nal	1-Naftalanina	
2-Nal	2-Naftalanina	

Cha	$\beta$ -Ciclohexilalanina	
Tic o tic (D- Tic)*	Ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (D o L)	
Nle o nle (D-Nle)	L-Norleucina o D-Norleucina	
PE	Ácido piroglutámico	
4-PhP*	4-Fenilprolina	
Pip*	Ácido pipercolínico	
Abu o abu (D-abu)	Ácido 2-amino-butírico	
3,4-Cl2F (D o L)	3,4-diclorofenilalanina	
	Ácido 5-aminovalérico	
O2Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico	

\*) esto marca aminoácidos revelados con fines de referencia

Nal se refiere tanto a 1-naftalanina como a 2-naftalanina, con preferencia, 2-naftalanina.

4-Fenilprolina se refiere tanto a 4-fenilprolina cis como trans, con preferencia, 4-fenilprolina trans.

Como se usa en la presente, el término "amida" se refiere a un derivado de amida del grupo ácido carboxílico en el término C (por ejemplo,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NH$ -alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-C(O)NH$ -alquil  $C_{2-2}$ -fenilo,  $-C(O)NH$ -NHBn,  $-C(O)$ -4-fenoxipiperidina o  $-C(O)N$  (alquilo  $C_{1-6}$ )<sub>2</sub>).

El término "amida" también se refiere a derivados del grupo amino en el término N (por ejemplo,  $-NHC(O)$ alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-NHC(O)(CH_2)_nPh$  (n es un número entero de 1 a 6),  $-NHC(O)(CH_2)_2CO_2H$ , 4-Cl-Ph-( $CH_2$ )<sub>3</sub>C(O)NH-,  $C_{11}H_{23}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$ ,  $C_{13}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-NH-$ ;  $C_{15}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)NH-$ , Ph- $CH_2CH_2NHC(O)-NH-$  o  $CH_3(OCH_2CH_2)_mC(O)NH-$  (m es un número entero de 1 a 12).

Como se usa en la presente, el término "éster" se refiere a un derivado de éster del grupo ácido carboxílico en la forma del término C (por ejemplo,  $-COOR$ ), en donde R del éster se refiere a grupos alquilo  $C_{1-6}$  tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc., grupos cicloalquilo  $C_{3-8}$  tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos arilo  $C_{6-10}$  tales como fenilo,  $\alpha$ -naftilo, etc., grupos alquil  $C_{6-10}$  arilo  $C_{1-6}$ , por ejemplo, grupos fenil-alquilo  $C_{1-2}$  tales como bencilo, fenetilo, benzhidrido, etc., y grupos  $\alpha$ -naftil-alquilo  $C_{1-2}$  tal como un grupo  $\alpha$ -naftilmetilo, y similares. También se puede mencionar el éster de pivaloiloximetilo y similares, que se usan comúnmente como ésteres para la administración oral. Cuando los polipéptidos de la invención poseen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en posiciones distintas del término C, aquellos polipéptidos en los que dichos grupos están amidados o esterificados también entran dentro de la categoría del polipéptido de la invención. En tales casos, los ésteres pueden ser, por ejemplo, los mismos tipos de ésteres que los ésteres C-terminales mencionados anteriormente.

El término alquilo se refiere a un resto hidrocarbonado completamente saturado, ramificado o no ramificado (o de cadena recta o lineal), que comprende de 1 a 20 átomos de carbono. Preferiblemente, el alquilo comprende de 1 a 7 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

El término arilo se refiere a grupos hidrocarbonados aromáticos monocíclicos o bicíclicos que tienen 6-10 átomos de carbono en la porción de anillo. Los ejemplos representativos de arilo son fenilo o naftilo.

El término heteroarilo incluye heteroarilo monocíclico o bicíclico, que contiene de 5 a 10 miembros del anillo seleccionados de átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos, y cada uno de ellos se selecciona independientemente de O, N o S, en donde S y N pueden oxidarse a diversos estados de oxidación. Para el sistema heteroarilo bicíclico, el sistema es completamente aromático (es decir, todos los anillos son aromáticos).

El término cicloalquilo se refiere a grupos hidrocarbonados monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos saturados o insaturados pero no aromáticos de 3-12 átomos de carbono, preferiblemente 3-8 ó 3-7 átomos de carbono. Para el sistema cicloalquilo bicíclico y tricíclico, todos los anillos son no aromáticos.

El término heterociclilo se refiere a un anillo no aromático saturado o insaturado (parcialmente insaturado) que es un monocíclico de 4, 5, 6 ó 7 miembros, y contiene al menos un heteroátomo seleccionado de O, S y N, donde N y S también pueden ser oxidados opcionalmente a varios estados de oxidación. En una realización, el resto heterociclilo representa un anillo monocíclico saturado que contiene de 5 a 7 átomos de anillo y que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional, seleccionado de O, S o N.

El término "APJ" (también denominado "receptor de apelina", "receptor 1 similar a la angiotensina", "receptor 1 similar a angiotensina II" y similares) indica un receptor de dominio de 380 residuos, transmembrana 7, acoplado a G<sub>i</sub>, cuyo gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en humanos (secuencia de referencia NCBI: NP\_005152.1 y codificado por la secuencia de referencia NCBI: NM\_005161). APJ se clonó por primera vez en 1993 a partir de ADN genómico humano usando cebadores de oligonucleótidos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136: 355-60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor de angiotensina II tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina II no se une con APJ. Aunque huérfano durante muchos años, el ligando endógeno ha sido aislado y llamado apelina (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

El término "apelina" indica una preproteína de 77 residuos (secuencia de referencia del NCBI: NP\_0059109.3 y codificada por la secuencia de referencia del NCBI: NM\_017413.3), que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos del apelina, 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 13mero de apelina (apelina-13), denominada "Pyr<sup>1</sup>-apelina-13" o Pyr<sup>1</sup>-apelina-13". Se describen diferentes formas de apelina, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 6.492.324 B1.

El término "conjugado" y "bioconjugado" se usa de manera indistinta y pretende referirse a la entidad formada como resultado de una unión covalente entre un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, y un resto que prolonga la vida media, opcionalmente a través del ligador.

El término resto de prolongación de la vida media se puede ligar/unir covalentemente a un péptido o análogo de

5 polipéptido. Un resto de prolongación de la vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo colesterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido natural o sintético que se una a un receptor de rescate. Preferiblemente, el resto que prolonga la vida media está unido en forma covalente, opcionalmente a través de un ligador, a la proteína plasmática (albúmina) con vidas medias séricas largas. Por ejemplo, el resto que prolonga la vida media es albúmina de suero humano (HSA) o polipéptidos de unión a albúmina.

10 La expresión "mayor vida media" o "aumentar la vida media en suero" o "vida media prolongada" significa el cambio positivo en la vida media circulante de una molécula biológicamente activa modificada (por ejemplo, apelina 13) en relación con su forma no modificada (o forma desnuda del péptido). La vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La medición del cambio en la concentración sérica con el tiempo permite el cálculo de la vida media sérica de una molécula modificada (por ejemplo, una molécula conjugada). Al comparar la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo, una molécula conjugada), con una molécula no modificada (por ejemplo, la apelina 13), se puede determinar el aumento relativo en la vida media en suero o  $t_{1/2}$ . Es deseable que el aumento sea al menos aproximadamente el doble, pero un aumento más pequeño puede ser útil.

20 Polipéptidos de la invención:

En el presente documento se describen diversas realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones y, además, como divulgación con fines de referencia. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características específicas para proporcionar realizaciones adicionales.

25 En la realización 1, la descripción proporciona, por lo tanto, un péptido o una fórmula polipeptídica (I) (SEQ ID NO: 1):

30 X1-X2-X3-R-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente, Q, A o pE;

35 X2 es R o r;

X3 es P o 4-PhP;

40 X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3,4-CI2-F o Nal;

X6 es un D-aminoácido, S o A;

X7 es un D-aminoácido, L, H o Aib; y al menos uno de X6 y X7 es D-aminoácido o Aib;

45 X8 es K, k, Q o E;

X9 es G o D;

50 X10 es P o ácido pipercolico;

X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;

X12 está ausente, P o un D-aminoácido;

55 X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido;

en donde:

Nle es L-norleucina;

60 D-Nle es D-norleucina;

Nal es L-(naftil)alanina;

65 D-Nva es D-norvalina;

Aib es ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico;

Cha es (S)-p-ciclohexilalanina;

5 D-Tic es ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico; pE es ácido L-piroglutámico;

3,4-Cl<sub>2</sub>-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina;

10 Y es L-tirosina; e Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente.

En la realización 1a, la descripción proporciona, por lo tanto, un péptido o una fórmula polipeptídica (IA) (SEQ ID NO: 2):

15 X1-X2-X3-R-X5-X6-X7-X8-G-X10-X11-X12-X13 IA

en donde:

20 X1 es el término N del polipéptido y está ausente Q, A o pE;

X2 es R o r;

25 X3 es P o 4-PhP;

X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3,4-Cl<sub>2</sub>-F o 2-Nal;

X6 es un D-aminoácido o S;

30 X7 es un D-aminoácido, H o Aib; y al menos uno de X6 y X7 es D-aminoácido o Aib;

X8 es K o k;

35 X10 es P o ácido pipercolico;

X11 es D-Nle o Nle;

X12 está ausente, P o un D-aminoácido;

40 X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

45 En la realización 1b, la descripción se refiere a un péptido o una fórmula polipeptídica (I) o (IA), en la que X1 está ausente o pE (SEQ ID NO: 3), o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente.

50 En un aspecto de la realización 1, 1A o 1B, la divulgación se refiere a un péptido o polipéptido de la fórmula I o IA en el que el grupo amino en la cadena lateral de K o k está opcionalmente unido a un ácido graso a través de un enlace amida. En un aspecto adicional de esta realización, el ácido graso se selecciona de lauroílo, miristoílo o palmitoílo, en el que el lauroílo es C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>C(O)-, miristoílo es C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>C(O)- y palmitoílo es C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>C(O)-.

55 En un aspecto de la realización 1, 1A o 1B, la divulgación se refiere a un péptido o polipéptido de la fórmula I o IA en el que el grupo amino en la cadena lateral de K o k está opcionalmente unido a un grupo lipófilo a través de un enlace amida, en donde el grupo lipófilo se selecciona entre un ácido graso como se describió anteriormente y lauroílo (O<sub>2</sub>Oc), miristoílo (O<sub>2</sub>Oc) y palmitoílo (O<sub>2</sub>Oc) y en el que el laurilo (O<sub>2</sub>Oc) es C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>C(O)-; miristoílo (O<sub>2</sub>Oc) es C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>C(O)-; palmitoílo (O<sub>2</sub>Oc) es C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>C(O)-. Ejemplos de ácidos grasos de cadena lateral se han descrito en la solicitud provisional US N.º 61/591.557 (número de expediente PAT054961-US-PSP) presentada el 27 de enero de 2012.

60 En la realización 2, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 1, 1A o 1B, en donde X6 y X12 son D-aminoácidos (SEQ ID NO: 4); o una amida, un éster o una de sus sales.

65 En la realización 3, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 2, en el que X13 es D-aminoácido (SEQ ID NO: 5); o una amida, un éster o una de sus sales.

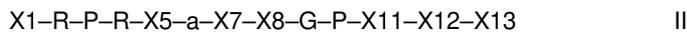
En la realización 4, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 2, en donde X11 es D-aminoácido (SEQ ID NO: 6); o una amida, un éster de una de sus sales.

5 En la realización 5, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 1, 1A o 1B, en donde X6 y X13 son D-aminoácidos (SEQ ID NO: 7); o una amida, un éster o una de sus sales.

10 En la realización 6, la descripción se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 1, 1A o 1B, en donde X7 y X12 son D-aminoácidos (SEQ ID NO: 8); o una amida, un éster o una de sus sales.

En la realización 7, la descripción se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 6, en donde X13 es un D-aminoácido (SEQ ID NO: 9); o una amida, un éster o una de sus sales.

15 En la realización 8, la invención se refiere a un polipéptido que activa el receptor de APJ de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 (1A o 1B) a 7 que tienen la siguiente fórmula II (SEQ ID NO: 10):



en donde:

20 X1 es el término N del polipéptido y es pE;

X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3,4-Cl<sub>2</sub>-F o Nal;

25 X7 es un D-aminoácido, L, H o Aib;

X8 es K;

30 X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;

X12 está ausente o un D-aminoácido seleccionado de a, f, p, e, abu, nva, y D-Leu;

X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido;

35 en donde:

abu es ácido 2-amino-butírico;

40 Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

Nal es L-naftil)alanina;

45 D-Nva es D-norvalina;

Aib es ácido α-aminoisobutírico;

50 Cha es (S)-p-ciclohexilalanina;

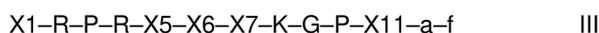
pE es ácido L-piroglutámico;

3,4-Cl<sub>2</sub>-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina; y

55 Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;

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

60 En la realización 9, la invención se refiere a un polipéptido que activa el receptor de APJ de acuerdo con la realización 8 que tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 11):



65 en donde, sin embargo, X6 es a;

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

En la realización 10, la invención se refiere a un polipéptido que activa el receptor de APJ de acuerdo con la realización 9 que tiene la fórmula IV (SEQ ID NO: 12):

5 X1-R-P-R-X5-S-X7-K-G-P-X11-X12-X13 IV

en donde

10 X1 es el término N del polipéptido y es pE;

X5 es L;

X7 es un D-aminoácido o Aib;

15 X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;

X12 está ausente, P o un D-aminoácido;

20 X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es D-aminoácido; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

25 En la realización 11, la divulgación se refiere a un polipéptido según cualquiera de las realizaciones 1 (1A o 1B) a 9, en la que X6 es un D-aminoácido seleccionado de a, D-Leu, k, s, d, nva, abu, f, h, v y D-Cys (fBu) (SEQ ID NO: 13); o una amida, un éster o una de sus sales. En un aspecto adicional de esta realización, X11 es nle o f.

30 En la realización 12, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 8, 9 ó 10, en donde X7 es Aib o un D-aminoácido seleccionado de a, f y h (SEQ ID NO: 14); o una amida, un éster o una de sus sales.

En la realización 13, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 (1A o 1B) a 12, en donde X12 está ausente o un D-aminoácido seleccionado de a, f, p, e, r, abu, nva y D-Leu (SEQ ID NO: 15); o una amida, un éster o una de sus sales. En un aspecto adicional de esta realización, X12 es a.

35 En la realización 14, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 (1A o 1B) a 13, en donde X13 está ausente o es un D-aminoácido seleccionado de f, y, d, y D-Tic (SEQ ID NO : 16), o una amida, un éster o una de sus sales. En un aspecto adicional de esta realización, X13 es f.

40 En la realización 15, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 14, en donde X13 está ausente o f (SEQ ID NO: 17); o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

45 En la realización 16, la invención se refiere a un polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores en la medida en que se caracterizan como realizaciones de la invención, en las que X1 es pE (SEQ ID NO: 18); o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

50 En la realización 16A, la divulgación se refiere a un polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores en las que X1 está ausente, A o Q (SEQ ID NO: 19); o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En un aspecto particular de esta realización, el péptido está unido covalentemente a un resto que prolonga la vida media a través de su término N A o Q.

En la realización 17, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 8, 9, 10 ó 12, en la que X5 es L (SEQ ID NO: 20); o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

55 En la realización 18, la divulgación se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en donde X8 es K (SEQ ID NO: 21); o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 19, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que X11 es Nle o nle (SEQ ID NO: 22); o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

60 En la realización 20, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención anteriores, en la que el término C es una amida; o una sal del polipéptido.

65 En la realización 21, la invención se refiere a un polipéptido según la realización 20, en el que el término C es una amida de la fórmula -C(O)-R2 y R2 es -NH<sub>2</sub>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph o 4-fenoxipiperidina; o una sal del polipéptido.

En otra realización, la divulgación se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I,

5 IA, II, III o IV, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 15 y 17-21) o una amida, un éster o una de sus sales, en la que X1 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En un aspecto de esta realización, el término N del péptido es una amida. En un aspecto adicional de esta realización, la divulgación se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I, IA, II, III o IV, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, o una amida, un éster o una de sus sales, en donde X1 está ausente y el término N es una amida de la fórmula -NHR y R es CH<sub>3</sub>C(O)-, CH<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)-, palmitoil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub>, miristoil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub>, lauroil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub> o Ph-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)-, o Ph-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-; y en la que

10 p es un número entero de 1 a 4;  
m es un número entero de 1 a 12;

Lauroil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub> es C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>C(O)[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)]<sub>p</sub>-;

15 Miristoil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub> es C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>C(O)[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)]<sub>p</sub>-;

Palmitoil(O<sub>2</sub>Oc)<sub>p</sub> es C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>C(O)[NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(O)]<sub>p</sub>-. En un aspecto particular de esta realización, R es acetilo, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)-, o Ph-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-. Se han descrito ejemplos de amidas N-terminales en la solicitud provisional US N.º 61/591.557 (número de expediente PAT054961-US-PSP) presentada el 27 de enero de 2012.

20

En otra realización, la invención se refiere a péptidos o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas II, III o IV, como, respectivamente, se definen en las reivindicaciones, o una amida, un éster o una sal de ellos, en la que el término N es una amida de la fórmula NHR1 en donde R1 es CH<sub>3</sub>C(O)-, CH<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)-, palmitoil(O<sub>2</sub>Oc), miristoil(O<sub>2</sub>Oc), lauroil(O<sub>2</sub>Oc) o Ph-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)-; y en la que m, lauroil(O<sub>2</sub>Oc), miristoil(O<sub>2</sub>Oc) y palmitoil(O<sub>2</sub>Oc) se definen supra.

25

En otra realización, la divulgación se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I, IA, II, III o IV, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8 y 10 a 21), en donde X13 está ausente; o una amida, un éster o una de sus sales. En un aspecto particular de esta realización, el término C es una amida. En un aspecto adicional de esta realización, la divulgación o, en la medida en que entren en las reivindicaciones, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I, IA, II, III o IV, o una de cualquier otra clase y subclases descritas anteriormente, o una amida, un éster o una de sus sales, en donde el término C es una amida de la fórmula -C(O)R2 y R2 es -NH<sub>2</sub>, -NH-Me, -NH-NHBn, 4-fenoxipiperidin-1-ilo o -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph. En un aspecto preferido de esta realización, la divulgación o, en la medida en que entren en las reivindicaciones, la invención se refiere a péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, o una amida, un éster o una de sus sales, en el que el término C es una amida de la fórmula -C(O)R2 y R2 es -NH<sub>2</sub>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph o 4-fenoxipiperidin-1-ilo.

30

35

40

En una realización, la descripción se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 21, en donde tres de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En otra realización, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 21, en donde cuatro de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13.

45

En otra realización de la divulgación, X1, X2, X3, X5, X6, X7, X8. Los aminoácidos X9, X10, X11, X12 y X13 son aquellos definidos por X1, X2, X3, X5, X6, X7, X8. X9, X10, X11, X12 y X13 aminoácidos en la sección de ejemplos de abajo.

50

En otra realización, los polipéptidos individuales de acuerdo con la invención son aquellos enumerados en la sección de Ejemplos de abajo en la medida en que entren en las reivindicaciones o una sal farmacéuticamente aceptable de ellos.

55 A menos que se especifique lo contrario, la expresión "polipéptido de la presente invención" se refiere a un polipéptido de la fórmula II, III o IV como se define en las reivindicaciones; o una amida, un éster o una de sus sales.

A menos que se especifique lo contrario, las expresiones "polipéptidos de la presente invención", "péptidos de la presente invención", "agonistas del péptido apelina" y similares se refieren a péptidos y polipéptidos de la fórmula II, III o IV como se define en las reivindicaciones; o una amida, un éster o una de sus sales. Los péptidos y polipéptidos de la invención demuestran una actividad y/o estabilidad en plasma sustancialmente equivalentes o mejoradas sobre los péptidos y polipéptidos de apelina conocidos descritos en la presente, que incluyen, entre otros, apelina de tipo natural, apelina-13 y pir-1-apelina-13.

60

65 Los péptidos y polipéptidos de la divulgación, con fines de referencia, también abarcan péptidos y polipéptidos que son al menos aproximadamente el 95% idénticos a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las

fórmulas I, IA, II, III o IV, o una amida, un éster o una de sus sales, así como cualesquiera péptidos o polipéptidos enumerados específicamente en la presente, incluidos, entre otros, los ejemplos experimentales.

5 Como se usa en la presente, la frase "secuencia de aminoácidos homóloga", o variaciones de ella, se refiere a secuencias caracterizadas por una homología, a nivel de aminoácidos, de al menos un porcentaje específico y se usa de manera indistinta con "identidad de secuencia". Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen aquellas secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas y cuyos polipéptidos tienen la misma ligación y/o actividad. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos es homóloga si tiene al menos un 60% o más, hasta un 99% de identidad con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, una  
10 secuencia de aminoácidos es homóloga si comparte una o más, hasta 60, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones descritas con fines de referencia sólo si no están cubiertas por las reivindicaciones, las secuencias de aminoácidos homólogas no tienen más de 5 o no más de 3 sustituciones de aminoácidos conservativas.

15 La homología también puede estar a nivel de polipéptido. El grado o porcentaje de identidad de los péptidos o polipéptidos de la invención, o porciones de ellos, y diferentes secuencias de aminoácidos se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias dividida por la longitud de la "secuencia de la invención" o "secuencia extraña", lo que sea más corto. El resultado se expresa como porcentaje de identidad.

20 Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente 80–99,9%, preferiblemente 90–99,9% a la secuencia de aminoácidos descrita en los ejemplos específicos, y que posee una estabilidad en plasma superior a apelina–13 o pyr–1–apelina 13, entran dentro de la categoría del polipéptido de la divulgación. En una realización, la mejora de la estabilidad del plasma es de al menos 2 veces. En una realización, el polipéptido de la invención cubierto por las reivindicaciones tiene una estabilidad en plasma de al menos 30  
25 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención cubierto por las reivindicaciones tiene una estabilidad en plasma de al menos 60 minutos, o al menos 80 minutos, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

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

35 Un polipéptido como se describe en la presente, o su equivalente sustancial, por sustitución, deleción, adición o inserción de uno o más de los aminoácidos se puede mencionar como polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos equivalente(s) sustancial(es) en el sentido anterior. Un polipéptido como se describe en la presente, o su equivalente sustancial, por sustitución de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3 y más preferiblemente de 1 ó 2 aminoácidos con aminoácidos naturales o no naturales puede mencionarse como polipéptidos que contienen una  
40 secuencia de aminoácidos sustanciales equivalentes en el sentido anterior. Otras modificaciones y alteraciones pueden incluir el reemplazo de un L–aminoácido con un D–aminoácido, u otra variación que incluye, entre otras, fosforilación, carboxilación, alquilación y similares, siempre y cuando se mantenga la actividad agonista de APJ del péptido o el polipéptido de fórmulas I, IA, II, III o IV y se mejore la estabilidad del plasma sobre la forma piroglutamada de apelina–13. Por ejemplo, los D–aminoácidos son bien tolerados con respecto a la actividad y estabilidad del polipéptido en la posición 2 (X2), posición 6 (X6), posición 7 (X7), posición 8 (X8), posición 11 (X11),  
45 la posición 12 (X12) y la posición 13 (X13) de los péptidos y polipéptidos lineales de las fórmulas I, IA, II, III o IV.

En la realización 22, la invención se refiere además a un bioconjugado o uno de sus multímeros, que comprende:

50 a. un péptido o polipéptido de la fórmula II como se define en la realización 8, una amida, sal o éster del mismo, de acuerdo con dicha realización;

b. un resto que prolonga la vida media;

55 en el que dicho péptido o polipéptido y dicho resto de prolongación de la vida media están unidos en forma covalente, opcionalmente a través de un ligador.

60 En la realización 22A, el resto que prolonga la vida media está unido covalentemente al término N del péptido de la fórmula II como se define en la realización 8, III como se define en la reivindicación 2 o IV como se define en la reivindicación 3, opcionalmente a través de un resto ligador.

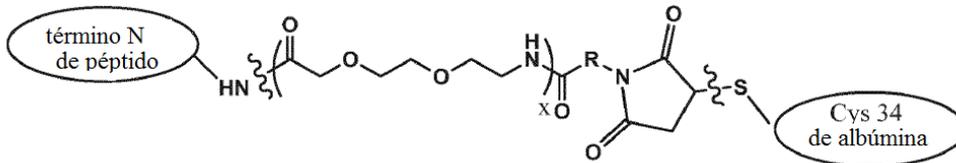
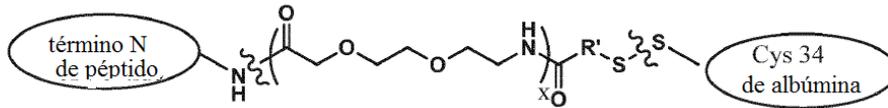
65 En la realización 22B, el resto de prolongación de la vida media está unido covalentemente al término C del péptido de la fórmula II como se define en la realización 8, III como se define en la reivindicación 2 o IV como se define en la reivindicación 3, opcionalmente a través de un resto ligador.

En la realización 22C, el resto que prolonga la vida media está unido covalentemente a una cadena lateral del péptido de la fórmula II como se define en la realización 8, III como se define en la reivindicación 2 o IV como se

define en la reivindicación 3, por ejemplo, el resto de prolongación de la vida media está unido a un grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Iso, opcionalmente a través de un resto ligador. Preferiblemente, el resto de prolongación de la vida media está unido al término N de dicho péptido, opcionalmente a través de un resto ligador.

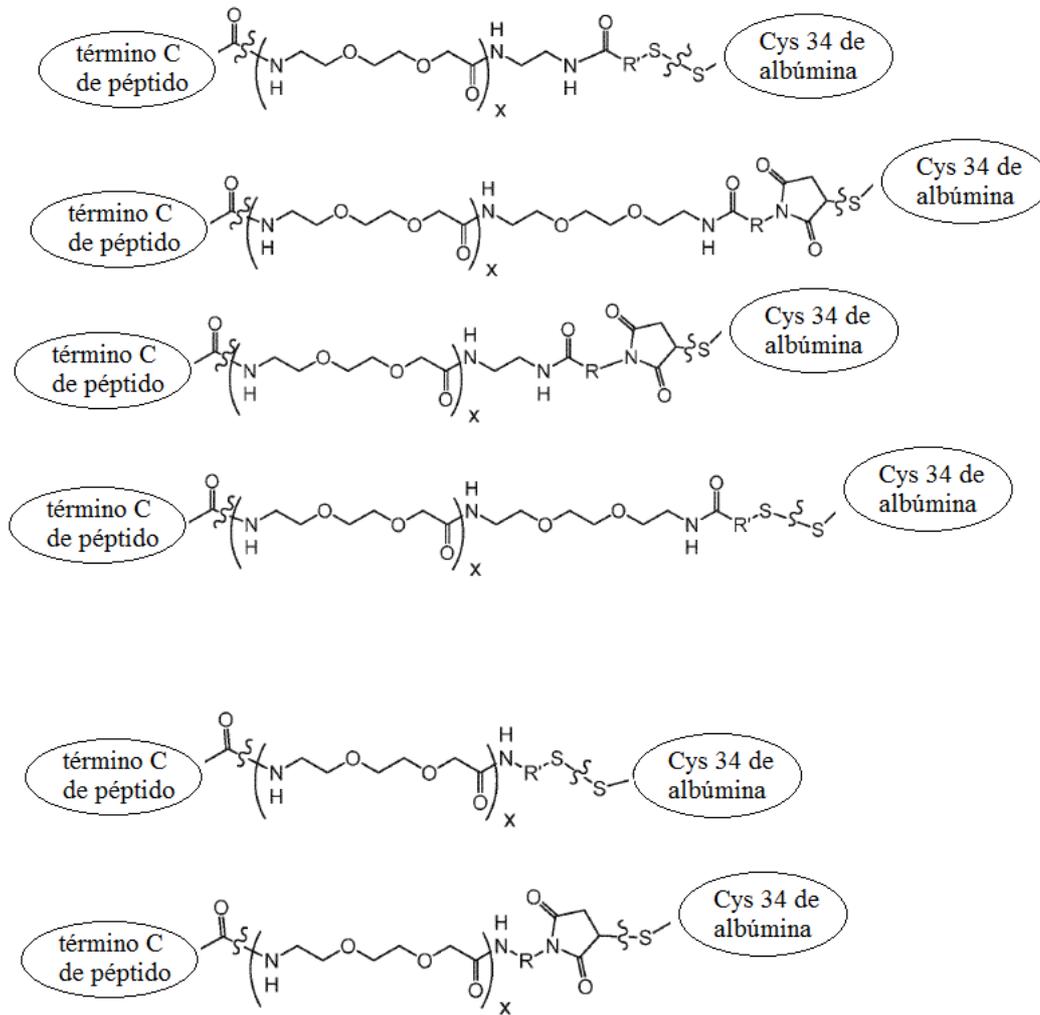
5 En la realización 23, la invención se refiere al bioconjugado o uno de sus multímeros, según la realización 19, en la que el resto que prolonga la vida media es una albúmina sérica humana.

10 En la realización 24, la invención se refiere al bioconjugado según la realización 23, en la que la albúmina sérica humana está unida químicamente al término N de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV a través de un ligador de las siguientes fórmulas:



15 en donde x es 1-20, R es alquileo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo de heteroarilo o una combinación de ellos, R' es alquileo lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o una combinación de ellos.

20 En la realización 25, la invención se refiere al bioconjugado según la realización 22 ó 23, en donde la albúmina sérica humana está unida químicamente al término C de un polipéptido de una cualquiera de las fórmulas I a IV a través de un ligador de las siguientes fórmulas:



donde x es 1–20, R es alqueno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo de heteroarilo o una combinación de ellos, R' es alqueno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o una combinación de ellos.

5 Resto que prolonga la vida media

El resto que prolonga la vida media de la invención puede estar unido covalentemente, ligado o conjugado a un péptido o análogo de polipéptido. Un resto de prolongación de la vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo colesterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína, polipéptido o péptido natural o sintético que se una a un receptor de rescate. Preferiblemente, el resto que prolonga la vida media está unido en forma covalente, opcionalmente a través de un ligador, a la proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con vidas medias séricas largas. Por ejemplo, el resto de prolongación de la vida media es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA) o polipéptidos de unión a albúmina. Preferiblemente, la porción de resto de vida media del bioconjugado es albúmina de suero humano.

Los restos que prolongan la vida media incluyen albúmina, que se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodaltons en su forma monomérica, dependiendo de las especies de origen. El término “albúmina” se usa indistintamente con “albúmina sérica” y no pretende definir la fuente de albúmina que forma un conjugado con los péptidos modificados de la invención. Por lo tanto, el término “albúmina”, como se usa en la presente, puede referirse a la albúmina purificada de una fuente natural como la sangre o el fluido seroso, o puede referirse a la albúmina sintetizada químicamente o producida de forma recombinante. Los péptidos o polipéptidos modificados de la invención están unidos preferentemente al grupo tiol libre de la cisteína-34 en la superficie de la albúmina, opcionalmente a través de un ligador.

Los restos que prolongan la vida media incluyen “Fc nativo”, que se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento de unión no antigénico resultante de la digestión de un anticuerpo completo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región

- bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque se prefieren IgG1 e IgG2. Las moléculas nativas de Fc están compuestas por polipéptidos monoméricos que pueden unirse a formas dimericas o multiméricas por medio de asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas varía de 1 a 4, según la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG (ver Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10:4071-9). La expresión "Fc nativo" como se usa en la presente es genérico para las formas monoméricas, dimericas y multiméricas.
- Los restos que prolongan la vida media incluyen la "variante de Fc" que se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo pero que aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor de Fc neonatal). Las publicaciones internacionales números WO 97/34631 y WO 96/32478 describen variantes de Fc de ejemplo, así como la interacción con el receptor de rescate. Por lo tanto, la expresión "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para el bioconjugado de la invención. Por lo tanto, la expresión "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos nativos de Fc, o en la que uno o más sitios o residuos de Fc han sido modificados, que afectan o están involucrados en: (1) formación de enlace disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor Fc distinto de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las variantes de Fc se describen con más detalle a continuación.
- Los restos que prolongan la vida media se refieren al "dominio Fc", que abarca las variantes y secuencias de Fc nativas y Fc como se definió anteriormente. Al igual que con las variantes de Fc y las moléculas de Fc nativas, la expresión "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas a partir de un anticuerpo completo o producidas por otros medios. En algunas realizaciones de la presente invención, un dominio Fc puede conjugarse con un polipéptido de la fórmula I' o cualquiera de las fórmulas I-IV mediante, por ejemplo, un enlace covalente entre el dominio Fc y la secuencia peptídica. Dichas proteínas Fc pueden formar multímeros a través de la asociación de los dominios Fc y tanto estas proteínas Fc como sus multímeros son un aspecto de la presente invención.
- Los restos que prolongan la vida media incluyen un "fragmento Fc modificado", que significará un fragmento Fc de un anticuerpo que comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo que comprende el CH2, CH3 y parte de la región bisagra. El fragmento Fc modificado se puede derivar de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- El término "multímero" aplicado a los dominios Fc o molécula que comprende dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas polipeptídicas asociadas de forma covalente.
- Ligador
- Cualquier grupo ligador es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crítica, ya que sirve principalmente como un espaciador.
- El ligador es un resto químico que contiene dos grupos reactivos/grupos funcionales, uno de los cuales puede reaccionar con el polipéptido y el otro con el resto que prolonga la vida media. Los dos grupos reactivos del ligador están enlazados a través de un grupo ligador, cuya estructura no es crítica siempre que no interfiera con el acoplamiento del ligador al péptido y el resto que prolonga la vida media.
- El ligador puede estar formado por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la presente invención, el ligador se compone de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos de origen natural. En diversas realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan entre los aminoácidos glicina, serina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, cisteína y lisina. En algunas realizaciones, un ligador está formado por una mayoría de aminoácidos que no tienen impedimentos estéricos, tales como glicina y alanina. En algunas realizaciones, los ligadores son poliglicinas, polialaninas, combinaciones de glicina y alanina (como poli(Gly-Ala)), o combinaciones de glicina y serina (como poli(Gly-Ser)). En otras realizaciones, el ligador comprende de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan de aminoácidos no naturales. Si bien se prefiere un ligador de 3-15 residuos de aminoácidos para la conjugación con el resto que prolonga la vida media, la presente invención contempla ligadores de cualquier longitud o composición. Un ligador de aminoácidos preferido es O2Oc de la siguiente fórmula:

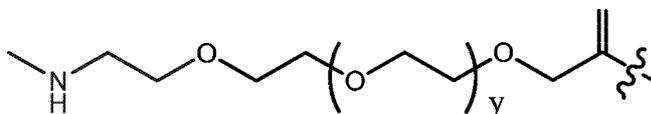


o sus unidades de repetición.

5 Los ligadores descritos en este documento son ilustrativos, y los ligadores que son mucho más largos y que incluyen otros residuos están contemplados por la presente invención. Los ligadores no peptídicos también están contemplados por la presente invención.

10 La porción de ligación del ligador puede comprender uno o más grupos alquilo, grupos alcoxi, grupos alqueno, grupos cicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo y grupos heterocíclicos o una combinación de ellos. Por ejemplo, se pueden usar ligadores de alquilo tales como  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_z-\text{C}(\text{O})-$  o  $-\text{S}-(\text{CH}_2)_z\text{C}(\text{O})-$  u  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_z\text{C}(\text{O})-$ , en donde  $z$  es 2–20. Estos ligadores de alquilo pueden ser sustituidos además por cualquier grupo que no sea estéricamente impedido, incluidos, entre otros, un alquilo inferior (por ejemplo,  $\text{C}_1$ – $\text{C}_6$ ), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN,  $\text{NH}_2$  o fenilo.

15 El ligador también puede ser de naturaleza polimérica. El ligador puede incluir cadenas o unidades de polímeros que sean bioestables o biodegradables. Los polímeros con enlaces repetidos pueden tener diversos grados de estabilidad en condiciones fisiológicas dependiendo de la capacidad de adhesión. Los polímeros pueden contener enlaces tales como policarbonatos ( $-\text{OC}(\text{O})-\text{O}-$ ), poliésteres ( $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ ), poliuretanos ( $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ ), poliamida ( $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ). Estos enlaces se proporcionan, a modo de ejemplo, y sin limitación, el tipo de enlaces utilizables en las cadenas de polímeros o ligadores de la invención. Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, diviniléter de anhídrido maleico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, derivados celulósicos y celulosa, derivados de almidón y almidón, polialquilenglicol y derivados de ellos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de ellos, polivinil etil éter, y los similares y mezclas de ellos. Un ligador de polímero es, por ejemplo, PEG. Un ligador no peptídico de ejemplo es un ligador de polietilenglicol:



30 en donde el ligador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kD, por ejemplo, de 100 a 500 kD.

Preferiblemente, el resto ligador contiene uno o más restos de aminoácidos tales como, por ejemplo, unidad de (O<sub>2</sub>C) o unidades de alquilen  $\text{C}_{1-4}-\text{C}(\text{O})-$ , alquilen  $\text{C}_{1-4}$ ,  $-\text{NH}-$ alquilen  $\text{C}_{2-6}-\text{NH}-$  o  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ diamino o una combinación de ellas y el resto ligador liga 2 grupos reactivos o grupos funcionales.

35 Preferiblemente, los grupos reactivos o grupos funcionales son maleimida, tiol o piridin-2-ildisulfanilo.

Preparación de péptido o polipéptido y constructo de péptido-ligador para la unión a un resto que prolonga la vida media:

40 Los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden producirse mediante los procedimientos conocidos per se para la síntesis de péptidos. Los métodos (en la medida en que proporcionan compuestos no cubiertos por las reivindicaciones descritas en este documento sólo con fines de referencia, en la medida en que cubren la preparación de los compuestos reivindicados aplicables a su producción, pero también se describen sólo como referencia) para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de una síntesis en fase sólida y una síntesis en fase líquida. Por lo tanto, el péptido y el polipéptido de interés pueden producirse condensando un péptido o aminoácido parcial capaz de constituir la proteína con la parte residual de la misma y, cuando el producto tiene un grupo protector, el grupo protector se separa, tras lo cual se puede preparar un péptido deseado. Los métodos conocidos de condensación y desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente bibliografía (1)–(5).

50 (1) M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966,

(2) Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965,

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

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

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

Después de la reacción, el péptido se puede purificar y aislar mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales como la extracción con solventes, cromatografía en columna, cromatografía líquida y recristalización. Cuando el péptido aislado como antes es un compuesto libre, se puede convertir en una sal adecuada por el método conocido. A la inversa, cuando el producto aislado es una sal, se puede convertir en el péptido libre por el método conocido.

La amida del polipéptido se puede obtener utilizando 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 alcohol 4-benciloxibencílico, resina de 4-metilbenzhidrilamina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetamidometilo, resina de poli(acrilamida), resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi, resina de cloruro de 2-clorotritilo, y así sucesivamente. Usando una resina de este tipo, los aminoácidos cuyos grupos  $\alpha$ -amino y grupos funcionales de cadena lateral se han protegido adecuadamente se condensan en la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo mediante diversas técnicas de condensación que son conocidas per se. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se eliminan de la resina y los grupos protectores se eliminan y, si es necesario, se forman enlaces disulfuro para obtener el polipéptido objetivo.

Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, se puede usar una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, como HATU, HCTU o, por ejemplo, una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Para la activación con dicho reactivo, un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, se puede usar HOBT u Oxyma Pure. El aminoácido protegido se puede agregar directamente a la resina junto con los reactivos de activación y el inhibidor de la racemización o se puede activar previamente como anhídrido de ácido simétrico, éster HOBt o éster HOOBT y luego agregarse a la resina. El disolvente para la activación de aminoácidos protegidos o la condensación con la resina se puede seleccionar adecuadamente entre aquellos disolventes que se sabe que son útiles para las reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, pueden mencionarse N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, dimetilsulfóxido, DMF, piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo o mezclas adecuadas de ellos.

La temperatura de reacción puede seleccionarse del intervalo hasta ahora conocido por ser útil para la formación de enlaces peptídicos y normalmente se selecciona del intervalo de aproximadamente  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El derivado de aminoácido activado se usa generalmente en una proporción de 1,5-4 veces en exceso. Si se descubre que la condensación es insuficiente mediante una prueba que utiliza la reacción con ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin eliminar el grupo protector. Si la condensación repetida no logra proporcionar un grado suficiente de condensación, el grupo amino que no reacciona puede ser acetilado con anhídrido acético o acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino para el material de partida aminoácido incluye Z, Boc, amiloxicarbonilo terciario, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo o Fmoc. El grupo protector de carboxi que puede usarse incluye, pero sin limitación, el alquilo  $\text{C}_{1-6}$  mencionado anteriormente, cicloalquilo  $\text{C}_{3-8}$  y aril  $\text{C}_{6-10}$ -alquilo  $\text{C}_{1-2}$ , así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, butoxicarbonilhidrazido terciario y tritilhidrazido.

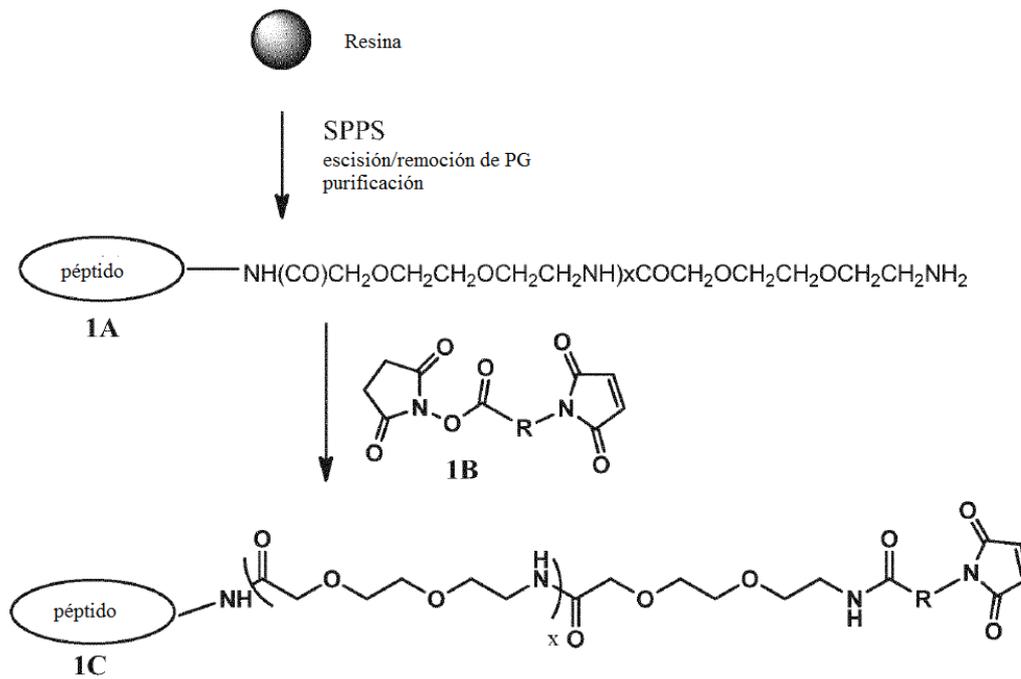
El grupo hidroxilo de serina y treonina puede protegerse por esterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha esterificación incluye grupos derivados de carbono tales como grupos alcanoilo inferior, por ejemplo, acetilo, etc., grupos aroilo, por ejemplo, benzoilo, etc., benciloxicarbonilo y etoxicarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación incluye bencilo, tetrahidropiranilo y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina incluye Bzl, Cl<sub>2</sub>-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z y butilo terciario.

El grupo protector de imidazol para 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 correspondiente anhídrido de ácido, azida y ésteres activos, por ejemplo, ésteres con alcoholes como pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, alcohol cianometílico, p-nitrofenol, HONB, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftalimida, HOBt, etc. El grupo amino activado del grupo aminoácido de partida incluye la fosforamida correspondiente.

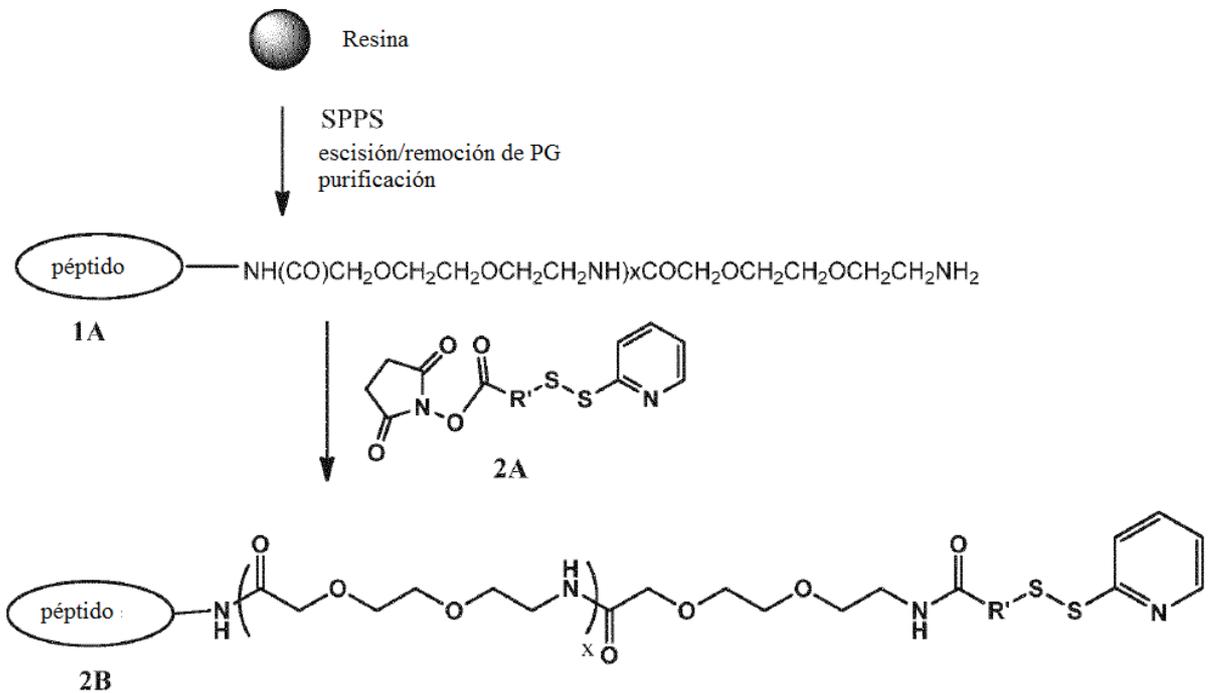
El método para la eliminación de grupos protectores incluye la reducción catalítica usando hidrógeno gaseoso en presencia de un catalizador tal como negro de paladio o paladio sobre carbón, tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metansulfónico, ácido trifluorometansulfónico, ácido trifluoroacético o una mezcla de tales ácidos, tratamiento de base con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, reducción con sodio metálico en amoniaco líquido. La reacción de eliminación mediante el tratamiento con ácido mencionado anteriormente se lleva a cabo generalmente a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se puede llevar a cabo ventajosamente con la adición de un aceptor de cationes como anisol, fenol, tioanisol, tricresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-

- 5 butanoditiol, 1,2-etanoditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado para proteger el grupo imidazol de histidina puede eliminarse mediante tratamiento con tiofenol, mientras que el grupo formilo utilizado para proteger el grupo indol de triptófano puede eliminarse mediante tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido de sodio o amoníaco acuoso diluido, así como el tratamiento ácido mencionado anteriormente en presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol.
- 10 El método para proteger los grupos funcionales que no deberían participar en la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden usar, el método para eliminar los grupos protectores y el método para activar los grupos funcionales que deben participar en la reacción pueden seleccionarse entre los grupos y métodos conocidos.
- 15 Otro método para obtener la forma amida del polipéptido comprende amidar el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal al principio, luego extender la cadena peptídica al lado N hasta la longitud de cadena deseada, y luego desproteger selectivamente el grupo  $\alpha$ -amino del péptido C-terminal y el grupo  $\alpha$ -carboxi del aminoácido o péptido que formará el resto del polipéptido objetivo y condensará los dos fragmentos cuyos grupos  $\alpha$ -amino y grupos funcionales de cadena lateral se han protegido con grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un disolvente mixto tal como el mencionado anteriormente en este documento. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser los mismos que los descritos con anterioridad. Del péptido protegido obtenido por condensación, todos los grupos protectores se eliminan mediante el método descrito anteriormente para proporcionar de este modo el péptido en bruto deseado. Este péptido en bruto puede purificarse mediante procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal puede liofilizarse para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Para obtener un éster del polipéptido, el grupo  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para dar un éster de aminoácido y luego, se sigue el procedimiento descrito anteriormente para la producción de la amida.
- 20 Los péptidos o polipéptidos terapéuticos modificados y/o el constructo de péptido-ligador incluyen grupos reactivos que pueden reaccionar con las funcionalidades reactivas disponibles en el resto que prolonga la vida media para formar un enlace covalente. Los grupos reactivos son grupos químicos capaces de formar un enlace covalente. Los grupos reactivos generalmente pueden ser carboxi, fosforilo, grupo acilo, éster o anhídrido mixto, maleimida, imidato, piridin-2-il-disulfanilo, capaces de formar un enlace covalente con funcionalidades como grupo amino, grupo hidroxilo, grupo carboxi o un grupo tiol en el sitio objetivo del resto de prolongación de la vida media o en un dominio Fc modificado químicamente como se describe a continuación. Los grupos reactivos de particular interés para unirse a una albúmina incluyen grupos que contienen maleimido y grupos que contienen piridin-2-il-disulfanilo.
- 25 Las funcionalidades son grupos de resto que prolongan la vida media con los que los grupos reactivos en péptidos o polipéptidos modificados son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes. Las funcionalidades incluyen grupos hidroxilo para unir con entidades de éster reactivas, grupos tiol para reaccionar con maleimidias, grupos que contienen maleimido o grupos piridin-2-ildisulfanilo, imidatos y tioésteres; y grupos amino para unirse a ácido carboxílico, grupos fosforilo, grupos acilo.
- 30 Los esquemas 1 a 3 describen la síntesis del constructo de péptido-ligador en el que el péptido es un péptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV.
- 35 El Esquema 1 describe la síntesis de un ligador que contiene maleimida unido al término N de un polipéptido de la fórmula I a IV.
- 40

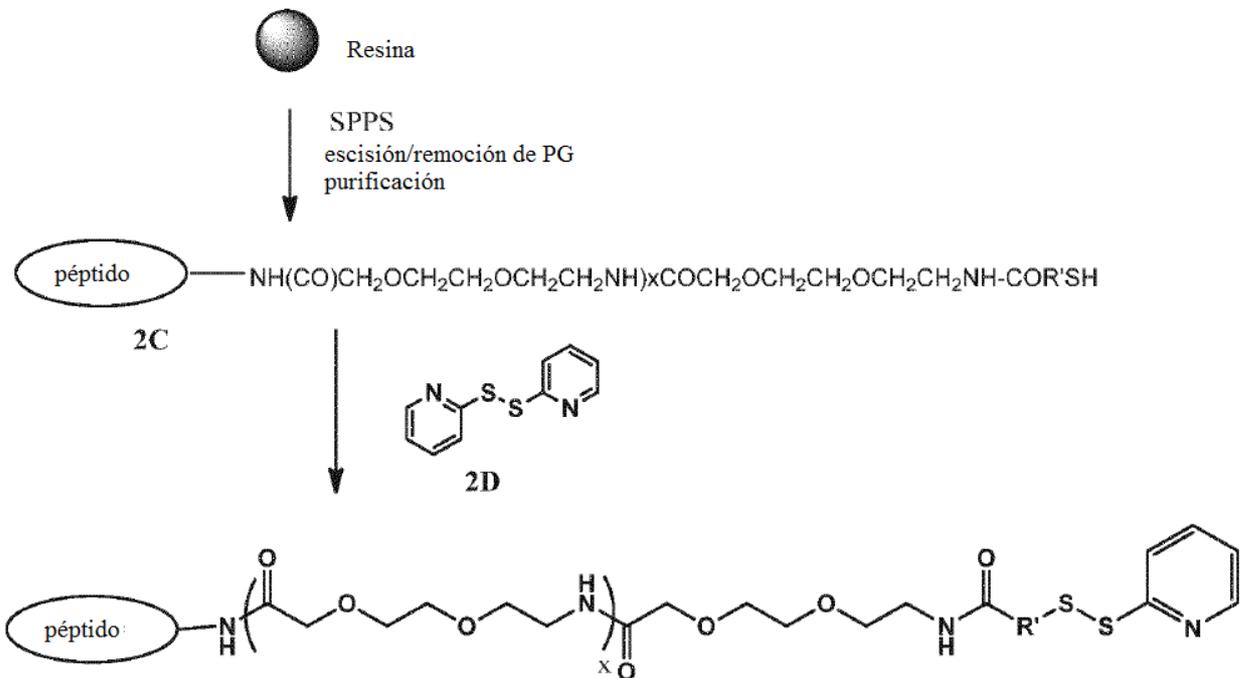


Esquema 1.

- 5 El término N del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos de O<sub>2</sub>C (x es 1 a 20, preferiblemente 1 a 10 y más preferiblemente 3 a 6) de acuerdo con la química de acoplamiento de amida bien establecida para generar (1A). La funcionalidad amino terminal de (1A) se hace reaccionar con un ácido activado (1B), en el que R es
- 10 alquileno, arilo, heteroarilo, cicloalquilo lineal o ramificado, o una combinación de ellos, para generar el constructo ligador que contiene péptido–maleimida (1C). El ácido activado (1B) está disponible comercialmente o está disponible fácilmente a partir de su correspondiente ácido carboxílico de acuerdo con la técnica conocida por un experto en la técnica. Preferiblemente, R es un alquileno lineal, y más preferiblemente R es –CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–. Alternativamente, para los péptidos que contienen una funcionalidad amino en la cadena lateral (por ejemplo, un péptido que contiene una lisina), se requiere un grupo protector ortogonal tal como Alloc antes de la reacción de acoplamiento, seguido de una etapa de desprotección adicional para obtener (1C).
- 15 El Esquema 2A y 2B describen la síntesis del ligador que contiene piridin–2–il–disulfanilo unido al término N–terminal de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de la fórmula I a IV.



Esquema 2A

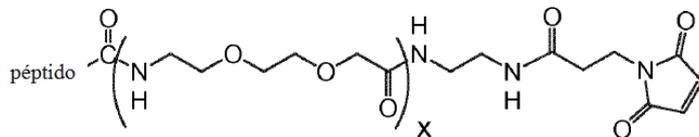
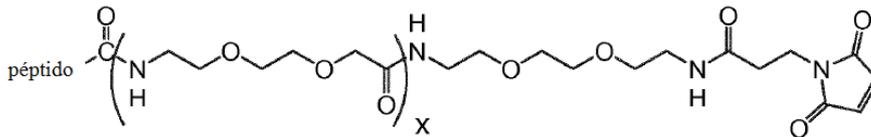
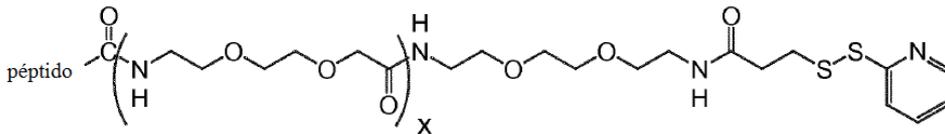
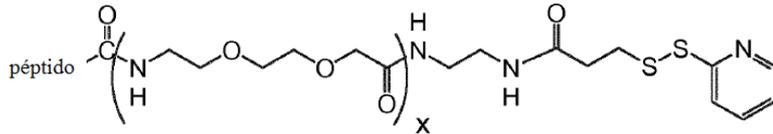


5 Esquema 2B

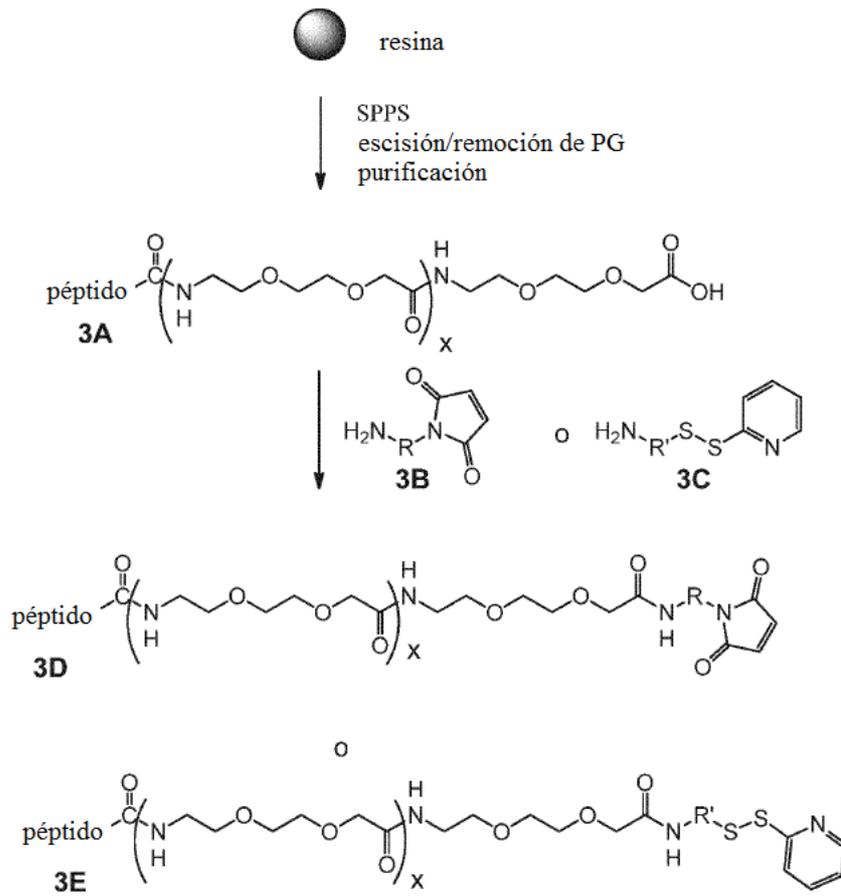
10 El constructo de péptido-ligador (1A) se prepara como se describe en el Esquema 1 y se hace reaccionar adicionalmente con un ácido activado de la fórmula (2A), en donde R' es un alqueno lineal o ramificado, para generar un péptido piridin-2-il-disulfanilo que contiene un constructor ligador (2B). El ácido activado (2A) está disponible en comercios o está disponible fácilmente a partir de su correspondiente ácido carboxílico de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Preferiblemente, R' es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. Alternativamente, el constructo ligador de péptidos (2C) se puede preparar utilizando HO<sub>2</sub>C-R'-SH, o una forma protegida de los mismos

(por ejemplo, grupos tritilo o Acm, que requieren etapas de desprotección adicionales) y se hace reaccionar con (2D) para generar el constructo ligador que contiene péptido–piridin–2–il–disulfanilo (2B).

- 5 Grupos reactivos similares se unen al término C del péptido de una manera similar a la descrita en los Esquemas 1, 2A y 2B utilizando una unidad de diamino tal como, por ejemplo,  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$  o  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-$ . Los ejemplos no limitativos de tales constructos de péptido–ligador son:

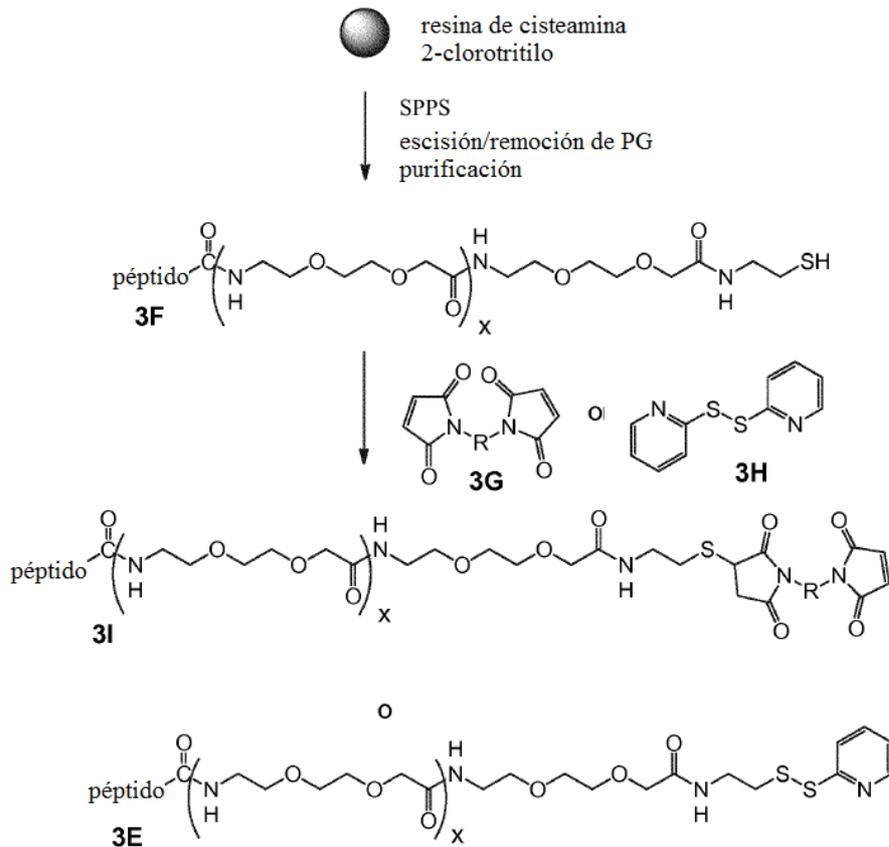


- 10 Alternativamente, se puede unir un grupo reactivo de maleimida o piridin–2–il–disulfanilo con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV de acuerdo con el esquema 3A, 3B y 3C:



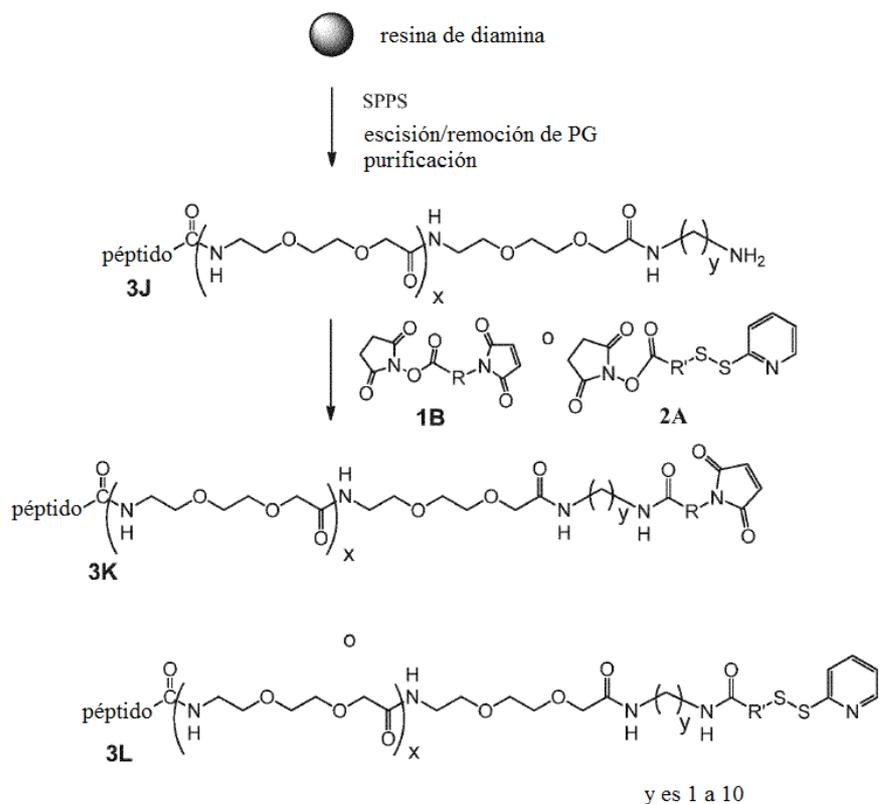
Esquema 3A

5 El grupo ácido carboxílico en el término C del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos de O<sup>2</sup>Oc usando condiciones de acoplamiento de amida estándar para generar (3A). La funcionalidad del ácido carboxílico terminal reacciona con el grupo amino de (3B) o (3C) en donde R y R' son como se definieron anteriormente, para generar los constructos de péptido–ligador (3D) o (3E). Además, cuando un péptido contiene una cadena lateral de funcionalidad carboxi (por ejemplo, Glu o Asp), se requieren grupos protectores ortogonales (por ejemplo, O–alilo) y etapas de desprotección adicionales.



10 Esquema 3B

El constructo péptido–ligador 3F se puede obtener utilizando una resina de cisteamina 2–clorotrieto y luego hacer reaccionar con 3G o 3H para generar el constructo de péptido–ligador 3I o 3E, respectivamente.



Esquema 3C

5 El constructo de péptido–ligador (3J) se puede obtener a partir de una resina de diamina y se puede hacer reaccionar adicionalmente con (1B) o (2A) para generar un constructo de péptido–ligador de la fórmula (3K) o (3L), respectivamente.

10 Los esquemas 1 a 3C describen constructos de péptido–ligador, más particularmente para uso en la preparación de un bioconjugado con albúmina. El grupo reactivo maleimida y el grupo reactivo piridin–2–il–disulfanilo reaccionan con la funcionalidad –SH de la cisteína 34 de la albúmina.

Bioconjugados

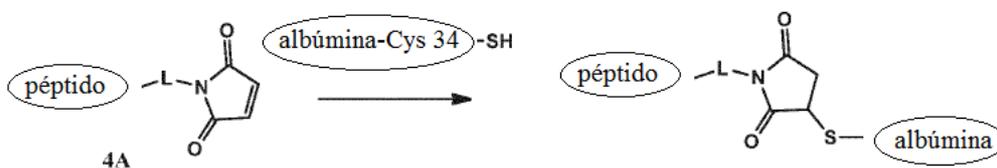
15 En una realización de la presente divulgación, un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV está conjugado (unido químicamente/covalentemente) a la funcionalidad tiol de la cisteína 34 de la albúmina. En una realización de esta realización, Albúmina–Péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina está conjugada (unida químicamente) al término N del péptido. En otra realización más, Albúmina–Péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina está conjugada (unida químicamente) al término C del péptido.

20 Se ha encontrado que los péptidos unidos covalentemente a la albúmina exhiben una vida media sustancialmente mayor in vivo que la contraparte no conjugada.

Preparación de conjugados:

25 Los esquemas 4 y 5 ilustran reacciones químicas para la conjugación de un péptido agonista de APJ o un péptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV y un resto que prolonga la vida media tal como un dominio Fc o albúmina.

El esquema 4 ilustra la conjugación de un péptido–ligador de la fórmula 4A con cisteína 34 de albúmina

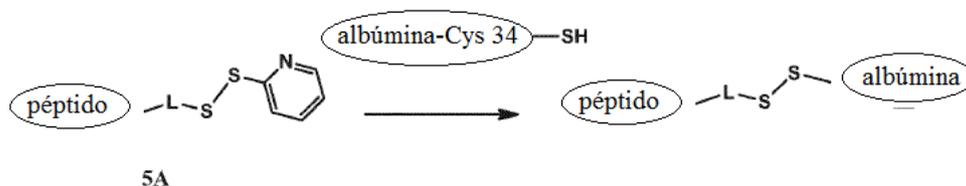


30

Esquema 4

en donde L representa un resto ligador entre el péptido y la funcionalidad de maleimida. En una realización particular, L es un resto de enlace como se describe en el Esquema 1, 3A, 3B o 3C.

5 El Esquema 5 ilustra la conjugación de un constructo de péptido–ligador de la fórmula 5A con Cisteína 34 de Albúmina.



10 Esquema 5

en donde L representa un resto ligador entre el péptido y la funcionalidad –S–S–piridina. En una realización particular, L es un resto ligador como se describe en los esquemas 2, 3A, 3B o 3C.

15 Los métodos para hacer conjugados y constructos de péptido–ligador como se describen en los Esquemas 1 a 5 también se han descrito y ejemplificado en la solicitud presentada conjuntamente (número de expediente: PAT055781–US–PSP).

20 Composiciones farmacéuticas

25 Los polipéptidos o bioconjugados de la presente invención como se reivindica, o una amida, un éster de una de sus sales, pueden administrarse, con fines de referencia, en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, inhalatoria, intranasal, oral, etc. Las realizaciones particularmente preferidas de la divulgación emplean la administración intravenosa continua de los polipéptidos o bioconjugados de la presente invención, o una amida, éster o sal de los mismos. Los polipéptidos de la presente invención pueden administrarse, con fines de referencia, como un bolo o como una infusión continua durante un período de tiempo. Puede usarse una bomba implantable. En ciertas realizaciones de la divulgación, la administración intermitente o continua de polipéptidos se continúa durante uno a varios días (por ejemplo, 2–3 días o más), o por períodos de tiempo más largos, por ejemplo, semanas, meses o años. En algunas realizaciones de referencia, se proporciona la administración de polipéptidos o bioconjugados intermitentes o continuos durante al menos aproximadamente 3 días. En otras realizaciones de referencia, se proporciona la administración de polipéptidos intermitente o continua durante al menos aproximadamente una semana. En otras realizaciones de referencia, se proporciona la administración de polipéptidos o bioconjugados intermitentes o continuos durante al menos aproximadamente dos semanas. Puede ser deseable mantener una concentración de polipéptido plasmático promedio por encima de un valor umbral particular durante la administración o entre la administración de dosis múltiples. Una concentración deseable puede determinarse, por ejemplo, en función de la condición fisiológica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, etc. Estos valores deseables pueden identificarse mediante la realización de ensayos clínicos estándar. Alternativamente, los péptidos y sus conjugados podrían administrarse por vía oral a través del mecanismo FcRn (Nat Rev Immunol. 7 (9), 715–25, 2007; Nat Commun. 3; 3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Liver Physiol 304: G262 –G270, 2013).

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o bioconjugado de la presente invención o una amida, un éster o una de sus sales y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede formularse para vías particulares de administración tales como administración oral, administración parenteral y administración rectal, etc. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse en forma sólida (incluyendo, sin limitación, cápsulas, comprimidos, pastillas, gránulos, polvos o supositorios), o en forma líquida (incluidas, entre otras, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes lubricantes o agentes tamponantes, así como adyuvantes, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y tampones, etc.

55 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables.

Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil aplicabilidad con

5 jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de preparación y almacenamiento y deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. En general, el portador relevante puede ser un disolvente o 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 adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. 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, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden esterilizarse y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de soluciones, 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 0,1 al 75%, o contienen aproximadamente 1 al 50% del ingrediente activo.

25 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada del mismo.

30 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, obleas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido para usar como un enjuague bucal. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante 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 esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja. Las formulaciones para administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

45 Para la administración por inhalación, los agentes terapéuticos de la invención se suministran preferiblemente en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Se observa que los pulmones proporcionan una gran área de superficie para la administración sistémica de agentes terapéuticos.

50 Los agentes pueden estar encapsulados, por ejemplo, en micropartículas poliméricas como las descritas en la publicación US 20040096403, o en asociación con cualquiera de una amplia variedad de otros vehículos de administración de fármacos que se conocen en la técnica. En otras realizaciones de la invención, los agentes se administran en asociación con un lípido cargado como se describe, por ejemplo, en la publicación US 20040062718. Se observa que este último sistema se ha utilizado para la administración de un polipéptido terapéutico, la insulina, que demuestra la utilidad de este sistema para la administración de agentes peptídicos.

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

60 Las composiciones adecuadas para la aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención con un portador adecuado. Los portadores adecuados para administración transdérmica incluyen disolventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos tienen la forma de una venda que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con portadores, opcionalmente una barrera que controla la velocidad para administrar el compuesto de la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un período de tiempo prolongado, y los medios para asegurar el dispositivo a la piel.

65 Las composiciones adecuadas para la aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones pulverizables, por ejemplo, para administración

por aerosol o similares. Dichos sistemas de administración tópica serán especialmente apropiados para la aplicación dérmica. Por lo tanto, son particularmente adecuados para su uso en formulaciones tópicas, incluso cosméticas, bien conocidas en la técnica. Tales pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes que mejoran la tonicidad, tampones y conservantes.

5 Como se usa en la presente, una aplicación tópica también puede referirse a una inhalación o a una aplicación intranasal. Pueden suministrarse convenientemente en forma de polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, o una partícula de componente mixto, por ejemplo con fosfolípidos) desde un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

10 La invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la que se descompondrá el compuesto de la presente invención como ingrediente activo. Dichos agentes, a los que se hace referencia aquí como “estabilizadores”, incluyen, pero sin limitación, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH o tampones salinos, etc.

15 Tal como se usa en la presente, la expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los polipéptidos de esta invención y, que típicamente no son biológicamente o indeseables desde otro punto de vista. En muchos casos, los polipéptidos de la presente invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

20 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canfosulfonato, cloruro/clorhidrato, cloroteofilonato, citrato, etandisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, sulfato de metilo, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

25 Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos de los cuales pueden derivarse 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 metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido toluensulfónico, ácido sulfosalicílico y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

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

35 Las bases orgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas presentes en la naturaleza, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico básicas, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

40 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto parental, un resto básico o ácido, por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K), o haciendo reaccionar formas de bases libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Tales reacciones se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo es deseable, cuando sea posible. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20.<sup>a</sup> edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en el “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

45 Como se usa en la presente, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, medicamentos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, y combinaciones de los mismos, como conocerían los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.<sup>a</sup> edición). Mack Printing Company, 1990, pp. 1289–1329). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Utilidad de la invención:

- 5 La familia de péptidos apelina es la única familia natural conocida de ligandos para el receptor de APJ acoplado a la proteína G. El gen de la apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos de la apelina, tales como la forma modificada de la apelina-13 de apelina-36, apelina-16, apelina-13, apelina-12 y piroglutamato (Pyr<sup>1</sup>-apelina-13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, al unirse al receptor e APJ, transduce la señal a través de las proteínas Gi y Gq. En los cardiomiocitos, el acoplamiento de Gi o Gq produce cambios en el pH intracelular, la activación del PLC y la producción de IP3 que mejoran la sensibilidad al calcio del miofilamento y, en última instancia, dan como resultado una mayor contractilidad cardíaca.
- 10 El acoplamiento de Gi inhibe la producción de Gs, adenilil ciclasa y AMPc activada y aumenta los niveles de pAkt que conducen a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, la activación de APJ a través de Gi, pAKT conduce a un aumento de la producción de óxido nítrico (NO), lo que aumenta la relajación del músculo liso que resulta en una vasodilatación general.
- 15 Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable tienen episodios agudos ocasionales de descompensación, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más y los síntomas empeoran. Estas exacerbaciones se conocen como insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF). Las terapias actuales para la ADHF incluyen diuréticos, vasodilatadores e inótropos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inótropos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) son bien conocidos por sus eventos adversos, como
- 20 arritmia y aumento de la mortalidad a largo plazo. Los análogos de polipéptidos de apelina sintéticos de la presente invención o su bioconjugado, proporcionan una terapia para ADHF que aumenta la contractilidad cardíaca sin riesgos arritmogénicos o de mortalidad y aborda la enorme necesidad médica no satisfecha en la insuficiencia cardíaca crónica.
- 25 De hecho, el tratamiento con apelina aguda (5 min) en humanos produce vasodilatación coronaria y mejora el gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben un t<sub>1/2</sub> muy corto (segundos) y una duración de la acción (pocos minutos) in vivo. Los potentes agonistas del péptido de apelina sintético de la presente invención tienen vidas medias más largas en comparación con la apelina nativa.
- 30 La activación del receptor de APJ en los cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardíaca a través de Gi/Gq, PLC y Ca<sup>2+</sup>, y b) proporciona cardioprotección a través de Gi, activación de pAkt, pero sin aumentar el cAMP (como se ve con otros inótropos). Además, el agonismo de APJ en las células endoteliales conduce a la vasodilatación arterial, lo que beneficia aún más la insuficiencia cardíaca al descargar el trabajo del ventrículo izquierdo. Tomados en conjunto, los análogos del polipéptido de apelina sintético pueden mejorar la función cardíaca general, reducir la
- 35 arritmogénesis y proporcionar un beneficio de supervivencia.
- Más recientemente, ha habido una serie de publicaciones de investigación preclínica centradas en la posible participación de apelina en la diabetes y la resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la apelina 1) reduce los niveles de glucosa en la sangre al mejorar la captación de glucosa en el músculo, el tejido adiposo y el corazón, 2) protege las células beta pancreáticas del estrés del RE y la subsiguiente apoptosis, 3) disminuye la secreción de insulina en las células beta, y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en tejido adiposo. La activación de la
- 40 ruta pAKT se ha implicado en estos procesos.
- 45 Los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o sus bioconjugados, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, propiedades agonistas del receptor de APJ, por ejemplo, como se indica en las pruebas in vitro e in vivo que se proporcionan en las siguientes secciones y, por lo tanto, están indicados para la terapia.
- 50 Los polipéptidos de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o los bioconjugados de ellos, pueden usarse para el tratamiento de una indicación seleccionada de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (insuficiencia cardíaca aguda descompensada), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, miocardiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras, lesiones (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.
- 55
- 60 Por lo tanto, como una realización adicional, la presente divulgación proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, para el tratamiento de una enfermedad que está asociada con la actividad del receptor de APJ. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista mencionada con anterioridad, adecuadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda. En otro subconjunto de esta realización, la presente divulgación proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera
- 65 de las fórmulas I a IV, o una amida, éster o una sal de él, o un bioconjugado de él, en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de una enfermedad que está asociada con la actividad del receptor de APJ.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente divulgación proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él, en terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que puede tratarse por activación (agonismo) del receptor de APJ.

5 En otra realización, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una de sus sales o uno de sus bioconjugados. En una realización adicional, la enfermedad se selecciona de la lista mencionada con anterioridad, adecuadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

10 En otro subconjunto de esta realización, la descripción proporciona un método para tratar una enfermedad que está asociada con la actividad del receptor de APJ que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados.

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

20 La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de doble función en la formulación que se utiliza. Normalmente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por lo tanto, la composición se puede administrar como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El refinamiento adicional de la dosis apropiada es realizado rutinariamente por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que rutinariamente realizan. Las dosis apropiadas se pueden determinar mediante el uso de datos adecuados de dosis-respuesta.

30 En otra realización no limitativa, la expresión “una cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del polipéptido de la presente invención o su bioconjugado, que, cuando se administra a una célula, un tejido o un material biológico no celular o un medio, es efectivo para activar al menos parcialmente el receptor de APJ. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que sea eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente que se administrará, el tejido diana, etc. Los expertos en la técnica entienden que “una cantidad terapéuticamente eficaz” puede administrarse en una dosis única o puede lograrse mediante la administración de dosis múltiples. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar insuficiencia cardíaca, una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para dar como resultado una mejoría clínica del paciente, por ejemplo, un aumento de la tolerancia/capacidad para el ejercicio, un aumento de la presión arterial, una disminución de la retención de líquido y/o mejores resultados en una prueba cuantitativa de funcionamiento cardíaco, por ejemplo, fracción de eyección, capacidad de ejercicio (tiempo de agotamiento), etc.

35 Como se usa en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere a, por ejemplo, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, 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 humano.

40 Como se usa en la presente, el término “inhibir”, “inhibición” o “inhibiendo” se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma o trastorno o enfermedad dados, o una disminución significativa en la actividad de base de una actividad o proceso biológico.

55 Tal como se usa en la presente, el término “tratar”, “tratando” o “tratamiento” de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, para mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En otra realización, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluidos aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambos. En otra realización más, “tratar”, “tratando” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retrasar la aparición o el desarrollo o la progresión de la enfermedad o trastorno.

60 Como se usa en la presente, los términos “prevenir”, “previniendo” y “prevención” se refieren a la prevención de la

recurrencia, el inicio o el desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resulta de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes terapéuticos).

5 Como se usa en la presente, un sujeto está “en necesidad de un tratamiento si dicho sujeto se beneficiara biológica, médicamente o en la calidad de vida de dicho tratamiento”.

10 Tal como se usa en la presente, el término “un”, “una”, “el” y “la” y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse de modo que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario por el contexto.

15 Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente pretende simplemente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención, excepto como se reivindica.

La actividad de un polipéptido de acuerdo con la presente invención se puede evaluar mediante los siguientes métodos in vitro descritos a continuación.

20 Ensayo de flujo de calcio hAPJ:

25 Células estables Chem-5 APJ (Millipore # HTS068C) se colocaron en placas en un formato de 384 pocillos con 10.000 células/pocillo en 25 ul de medio de crecimiento, luego se cultivaron durante 24 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C. Una hora antes del ensayo, se agregaron 25 µl/pocillo de tinte FLIPR Calcium 4 (Molecular Devices R8142) con probenecid 2,5 mM, y las células se incubaron durante una hora en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C. Los péptidos se solubilizaron en HBSS, HEPES y tampón BSA al 0,1%, y se diluyeron en serie 10 veces, de 50 uM a 5 pM, por triplicado. Se usó FLIPR Tetra para agregar péptido a las células con colorante (1:5, para concentraciones de péptido finales que varían de 10 uM a 1 pM). El tinte FLIPR dentro de las células emitió fluorescencia después de la unión al calcio, mientras que la fluorescencia del exterior de las células estaba enmascarada. La fluorescencia se midió utilizando 470 a 495 de excitación y 515 a 575 longitudes de onda de emisión en el FLIPR Tetra. Las lecturas se realizaron durante un total de 3 minutos, comenzando 10 segundos antes de la adición del péptido. Los valores máximos y mínimos se calcularon y representaron para cada concentración de péptido, y se usó el software GraphPad Prism para calcular los valores de EC<sub>50</sub> en los puntos de inflexión de la curva, para la estimación del flujo de calcio por péptidos.

35 Ensayo de estabilidad en plasma:

Materiales:

40 Solución de trabajo: se prepara 1 mg/ml de artículo de prueba en agua Milli-Q

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

45 Plasma: plasma de rata Sprague-Dawley macho (con heparina sódica), comprado en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY).

Sangre entera: sangre entera de Sprague Dawley masculina (con heparina sódica), adquirida en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

50 Homogenado de pulmón: pulmón de rata macho Sprague Dawley se adquirió de Bioreclamation LLC (Liverpool, NY). El pulmón se homogeneizó utilizando un homogeneizador politrón después de la adición de un volumen 5x de PBS 1X. El homogeneizado se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 30 minutos para obtener un sobrenadante transparente. La concentración de proteínas se determinó utilizando un kit comercial (Pierce, Thermo Scientific).

55 Procedimiento de preparación de la muestra: (péptidos)

60 El artículo de prueba se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: plasma de rata heparinizada, sangre entera de rata heparinizada o homogeneizado de pulmón. La muestra de plasma y sangre total se preparó a 5000 ng/ml agregando 5 uL de 1 mg/ml de solución de trabajo a 995 uL de plasma de rata o sangre total. Las muestras de homogeneizado de pulmón se prepararon diluyendo homogeneizado de pulmón a una concentración de proteína de 1 mg/ml con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de la adición de 5 uL de solución de trabajo a 995 uL de homogenado de pulmón diluido. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación suave (65 ~ 75 rpm) en una incubadora de baño de agua. A intervalos de 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 y 240 min, se transfirieron alícuotas de 25 uL de las muestras de incubación a una placa de 96 pocillos e inmediatamente se precipitaron proteínas utilizando 150 uL de solución de extracción. Después de completar el experimento de

incubación, la placa de muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Luego, se usó un dispositivo de pipeteo (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y agregar 50 uL de agua a todas las muestras. La placa se agitó en vórtex antes del análisis por LC–MS.

5 Procedimiento de preparación de la muestra (conjugados)

10 El artículo de prueba se preparó a 50.000 ng/mL agregando 5 uL de 1 mg/mL de solución de trabajo a 495 uL de plasma de rata. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación suave (65 ~ 75 rpm) en una incubadora de baño de agua. En los tiempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 y 24 horas, se transfirieron alícuotas de 50 uL de muestras de incubación a placas de 96 pocillos y se agregaron 100 uL de TCEP (tris(2–carboxietil)fosfina) a cada muestra. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Una vez completada la reacción, la precipitación de proteínas se realizó utilizando 300 ul de acetonitrilo. La placa de muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se usó un dispositivo de pipeteo (Tecan Temo) para transferir 125 uL de sobrenadantes a otra placa y se agregan 50 uL de agua a todas las muestras. La placa se agitó en vórtex antes del análisis por LC–MS.

15 Análisis de LC–MS de muestras de estabilidad.

HPLC: Agilent 1290 HPLC con automuestreador

20 Columna: MAC–MOD ACE C18, 3 µm, 30 mm x 2,1 mm i.d.

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

Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1% en agua

25 Programa de gradiente:

Tiempo (min)	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

30 Espectrómetro de masa: Agilent Q–TOF 6530

Modo de adquisición de datos: exploración completa con un rango de masa de 100 – 1000 m/z

Software de adquisición y análisis de datos: MassHunter

35 Análisis de los datos:

Ensayo de estabilidad: vida media de estabilidad, ( $t_{1/2}$ ), los valores se determinaron convirtiendo las áreas de los picos en cada punto de tiempo en el porcentaje restante con relación al área del pico inicial ( $t = 0$ ).

40 Porcentaje restante =  $100 \times (\text{área del pico de la muestra}) / (\text{t} = 0 \text{ área del pico})$

El registro natural del porcentaje de los valores restantes se calculó y representó en función del tiempo de muestra (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó mediante regresión lineal (Microsoft Excel).

45 La semivida de estabilidad se calculó mediante la fórmula,  $t_{1/2} = 0,693 / k$

Ensayo de estabilidad en plasma basado en la actividad de sustitución:

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 # RATPLNAHP-M, tratada con Heparina Na). Las lecturas se tomaron en los puntos temporales  $t_0$  y  $t_{24}$  h, después de la incubación en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C. La vida media del plasma del péptido en minutos se estimó calculando lo siguiente:

5

1)  $LN ((EC_{50} \text{ a } t_0)/(EC_{50} \text{ a } t_{24} \text{ hrs}))>$

10

2) Calcular la pendiente de valor arriba y

3)  $t_{1/2} = 0,693/(\text{pendiente} \wedge 2)$ .

15

Usando el ensayo de ensayo (como se describe anteriormente), los polipéptidos de la invención y los Ejemplos de referencia (ver Tabla 4) mostraron eficacia y estabilidad de acuerdo con las Tablas 2 y 3, que se proporcionan a continuación.

Tabla 2: Actividad y estabilidad de los polipéptidos

Péptido	hAPJ Ca <sup>2+</sup> Flujo EC <sub>50</sub> [nM]	Estabilidad en plasma en base a la actividad de sustitución $t_{1/2}$ [min]
Ejemplo 1	2,3	>1000
Ejemplo 2	385,7	>1000
Ejemplo 3	796,5	>1000
Ejemplo 4	5,0	730,4
Ejemplo 5	79,9	>1000
Ejemplo 6	3,1	>1000
Ejemplo 7	692,7	>1000
Ejemplo 8	7,7	>1000
Ejemplo 9	9,9	>1000
Ejemplo 10	154,6	>1000
Ejemplo 11	1063,8	>1000
Ejemplo 12	0,9	>1000
Ejemplo 13	1,1	>1000
Ejemplo 14	3,2	184,7
Ejemplo 15	2,1	>1000
Ejemplo 16	8,8	409,0
Ejemplo 17	3,1	>1000
Ejemplo 18	66,5	122,3
Ejemplo 19	169,5	>1000
Ejemplo 20	922,1	>1000

ES 2 705 323 T3

Ejemplo 21	0,9	>1000
Ejemplo 22	86,8	>1000
Ejemplo 23	2,8	124,8
Ejemplo 24	13,8	57,5
Ejemplo 25	69,2	241,5
Ejemplo 26	1,7	985,5
Ejemplo 27	120,9	348,9
Ejemplo 28	113,8	>1000
Ejemplo 29	1,8	565
Ejemplo 30	2,4	128,5
Ejemplo 31	99,0	346,6
Ejemplo 32	30,8	47,7
Ejemplo 33	14,8	>1000
Ejemplo 34	34,5	23,2
Ejemplo 35	10,7	>1000
Ejemplo 36	16,2	121,4
Ejemplo 37	3,9	523,5
Ejemplo 38	3,3	>1000
Ejemplo 39	4,5	888,5
Ejemplo 40	2,0	>1000
Ejemplo 41	4,5	42,2
Ejemplo 42	2,4	>1000
Ejemplo 43	2,0	178
Ejemplo 44	3,0	555
Ejemplo 45	2,4	>1000
Ejemplo 46	9,2	532
Ejemplo 47	4,4	>1000
Ejemplo 48	16,1	248
Ejemplo 49	623,0	>1000
Ejemplo 50	1,4	11
Ejemplo 51	8,5	>1000
Ejemplo 52	19,5	>1000
Ejemplo 53	8,7	>1000
Ejemplo 54	0,9	902

Ejemplo 55	72,8	101
Ejemplo 56	6,8	331
Ejemplo 57	1,5	>1000
Ejemplo 58	55,1	228
Ejemplo 59	7,4	849
Ejemplo 60	200,0	>1000
Ejemplo 61	7,9	>1000
Ejemplo 62	95,9	474
Ejemplo 63	9,4	225
Ejemplo 64	30,8	>1000
Ejemplo comparativo: Pyr <sup>1</sup> -apelina-13	1,8	5,0

Tabla 3: Correlación entre el ensayo de estabilidad en plasma y el ensayo de estabilidad en plasma en base a la actividad de sustitución:

5

Péptido	Estabilidad en plasma t <sub>1/2</sub> [min]	Ensayo de estabilidad en plasma en base a la actividad de sustitución t <sub>1/2</sub> [min]
Ejemplo 4	414	730
Ejemplo 14	405	185
Ejemplo 16	448	409
Ejemplo 17	365	>1000
Ejemplo 29	156	565
Ejemplo 30	121	128
Pyr <sup>1</sup> -Apelina 13	6,6	5,0

10

El polipéptido de la presente invención o su bioconjugado puede tener una potencia del receptor de APJ similar a apelina-13 o pyr<sup>1</sup>-apelina-13. En una realización, el polipéptido de la presente invención o su bioconjugado tiene una EC<sub>50</sub> de menos de 100 nM. En otra realización, el polipéptido de la invención o su bioconjugado tiene una EC<sub>50</sub> inferior a 50 nM, preferiblemente inferior a 25 nM y con mayor preferencia, inferior a 15 nM. En otra realización más, el polipéptido de la presente invención tiene una EC<sub>50</sub> de menos de 10 nM.

15

El polipéptido de la presente invención o su bioconjugado tiene una estabilidad en plasma superior a la apelina-13 o pyr<sup>1</sup>-apelina-13. En una realización, la mejora de la estabilidad del plasma es al menos 2 veces. En una realización, el polipéptido de la invención o su bioconjugado tiene una estabilidad en plasma de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención o su bioconjugado tiene una estabilidad en plasma de al menos 60 minutos, o al menos 80 minutos, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

20

El polipéptido de la presente invención o su bioconjugado puede formularse para administrarse simultáneamente o antes o después de uno o más agentes terapéuticos. El polipéptido de la presente invención puede formularse para administrarse por separado, por la misma vía o una vía de administración diferente, o juntos en la misma composición farmacéutica que los otros agentes.

- 5 En una realización, la invención proporciona un producto que comprende un polipéptido o una amida de un éster de una de sus sales, o un bioconjugado de él, cada uno cubierto por las reivindicaciones, y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para la administración simultánea, uso 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 de APJ como se describe en las reivindicaciones.
- 10 Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen (en la medida en que estén cubiertas por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia) una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una de sus sales o un bioconjugado de él, y el (los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) juntos en la misma composición farmacéutica, o un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado, y el otro o los otros agentes terapéuticos en forma separada, por ejemplo en forma de kit.
- 15 En una realización, la invención proporciona (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, por lo demás, únicamente con fines de referencia) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquier fórmula de fórmula I a IV, una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él y otro(s) agente(s) terapéutico(s). Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describió anteriormente.
- 20 En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (hasta el momento según lo cubierto por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia). En una realización, el kit comprende medios para retener por separado dichas composiciones, tales como un envase, una botella dividida o un paquete de lámina dividida. Un ejemplo de un kit de este tipo es un blíster, como se usa típicamente para el envasado de comprimidos, cápsulas y similares.
- 25 El kit de la invención puede ser para uso para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para valorar las composiciones separadas entre sí. Para ayudar al cumplimiento, el kit de la invención comprende típicamente instrucciones para la administración.
- 30 Para su uso en las terapias de combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico pueden ser fabricados y/o formulados por el mismo fabricante o por diferentes fabricantes. Además, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico se pueden juntar en una combinación para uso en terapia: (i) antes de la liberación del producto de la combinación a los médicos (por ejemplo, en el caso de un kit que comprende el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por el propio médico (o bajo la dirección del médico) poco antes de la administración; (iii) en el propio paciente, por ejemplo, durante la administración secuencial de un polipéptido de la invención y el otro agente terapéutico.
- 35 En consecuencia, la divulgación, con fines de referencia, proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él, para tratar una enfermedad o afección que responda al agonismo del receptor de APJ, en el que el medicamento se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La divulgación también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de apelina, en el que el medicamento se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados.
- 40 La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un bioconjugado de él, para uso en un método para tratar una enfermedad o afección sensible al agonismo (activación) del receptor de APJ como se define en las reivindicaciones, en las que (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, de otro modo sólo con fines de referencia) el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (siempre que estén cubiertos por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia). La invención también proporciona (en la medida en que lo cubren las reivindicaciones, de otro modo, sólo con fines de referencia) un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales, para uso en un método para tratar una enfermedad o condición que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (en la medida en que están cubiertos por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia).
- 50 La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un bioconjugado de él, para uso en un método para tratar una enfermedad o afección sensible al agonismo (activación) del receptor de APJ como se define en las reivindicaciones, en las que (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, de otro modo sólo con fines de referencia) el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (siempre que estén cubiertos por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia). La invención también proporciona (en la medida en que lo cubren las reivindicaciones, de otro modo, sólo con fines de referencia) un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales, para uso en un método para tratar una enfermedad o condición que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (en la medida en que están cubiertos por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia).
- 55 La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un bioconjugado de él, para uso en un método para tratar una enfermedad o afección sensible al agonismo (activación) del receptor de APJ como se define en las reivindicaciones, en las que (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, de otro modo sólo con fines de referencia) el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (siempre que estén cubiertos por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia). La invención también proporciona (en la medida en que lo cubren las reivindicaciones, de otro modo, sólo con fines de referencia) un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales, para uso en un método para tratar una enfermedad o condición que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para usar en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (en la medida en que están cubiertos por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia).
- 60 La divulgación, con fines de referencia, también proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (en la medida en que están cubiertos por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia).
- 65 La divulgación, con fines de referencia, también proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados (en la medida en que están cubiertos por las reivindicaciones, de lo contrario sólo con fines de referencia).

5 a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, para tratar una enfermedad o afección que responda al agonismo de receptor de APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas) con otro agente terapéutico. La divulgación también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas) con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados.

10 En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona de inótrupos, bloqueadores del receptor beta adrenérgico, inhibidores de la HMG-Co-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), bloqueadores de los canales de calcio (CCB), antagonistas endotelínicos, inhibidores de renina, diuréticos, imitadores de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de los receptores de aldosterona, bloqueadores de los receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de la CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesirituro) y un Inhibidor de la NEP.

15 La expresión “en combinación con” un segundo agente o tratamiento incluye la administración conjunta del polipéptido de la invención (por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I-IV o un bioconjugado de él o un polipéptido, bioconjugado descrito de otro modo en la presente, cada uno como en lo que se refiere a las reivindicaciones, de lo contrario, sólo con fines de referencia) con el segundo agente o tratamiento, la administración del compuesto de la invención primero, seguido del segundo agente o tratamiento y la administración del segundo agente o tratamiento primero, seguido del compuesto de la invención.

20 La expresión “segundo agente” incluye cualquier agente conocido en la técnica para tratar, prevenir o reducir los síntomas de una enfermedad o trastorno descrito en la presente, a saber, un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor de APJ seleccionado del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluida la quemadura solar) y preeclampsia.

25 Los ejemplos de segundos agentes incluyen inotrópicos, bloqueadores del receptor beta adrenérgico, inhibidores de la HMG-Co-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), bloqueadores de los canales de calcio (CCB), antagonistas de la endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de apoA, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores del receptor de aldosterona, bloqueadores del receptor de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de la CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesiritide) y/o un inhibidor de la NEP.

30 Los inótrupos como se usan en este documento incluyen, por ejemplo, dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendán, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol y digoxina.

35 Los bloqueadores del receptor beta adrenérgico como se usan en este documento incluyen, por ejemplo, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol.

40 Los anticoagulantes como se usan en este documento incluyen dalteparina, danaparoide, enoxaparina, heparina, tinzaparina, warfarina.

45 La expresión “inhibidor de la HMG-Co-A reductasa” (también llamado beta-hidroxi-beta-metilglutaril-co-enzima-A-reductasa) incluye agentes activos que pueden usarse para disminuir los niveles de lípidos, incluido el colesterol en la sangre. Los ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosvastatina, simvastatina y velostatina, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

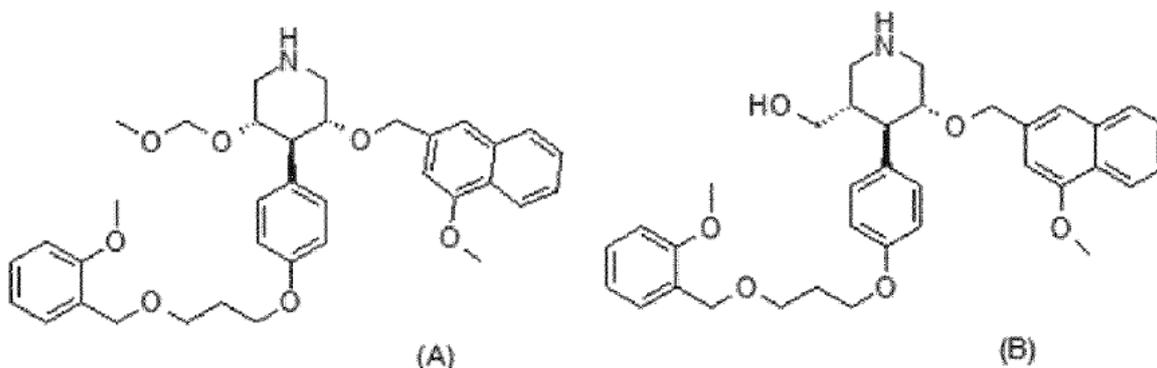
50 La expresión “inhibidor de la ECA” (también llamado inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina) incluye moléculas que interrumpen la degradación enzimática de la angiotensina I en la angiotensina II. Dichos compuestos se pueden usar para la regulación de la presión arterial y para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Los ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilato, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilato, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, espirapril, temocapril y trandolapril o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

55 La expresión “antagonista de la endotelina” incluye bosentán (cf. documento EP 526708 A), tezosentán (cf. documento WO 96/19459), o sus sales farmacéuticamente aceptables.

60 La expresión “inhibidor de renina” incluye ditekiren (nombre químico: [1S-[1R\*,2R\*,4R\*(1R\*,2R\*)]]-1-[(1,1-dimiletotoxi)carbonil]-L-prolil-fenilalanil-N-[2-hidroxi-5-metil-1-(2-metilpropil)-4-[[[2-metil-1-[[[2-piridinilmetil]amino]carbonil]butil]amino]carbonil]hexil]-N-alfa-metil-L-histidinamida); terlakiren (nombre químico:

65

5 [R- (R\*,S\*)]-N-(4-morfolinilcarbonil)-L-fenilalanil-N-[1-(ciclohexilmetil)-2-hidroxi-3-(1-metiletoxi)-3-oxopropil]-S-metil-L-cisteinamida); Aliskiren (nombre químico: (2S,4S,5S,7S)-5-amino-N-(2-carbamoil-2,2-dimetiletil)-4-hidroxi-7-[[4-metoxi-3-(3-metoxipropoxi)fenil]metil]-8-metil-2-(propan-2-il)nonanamida) y zankiren (nombre químico: [1S-[1R\*(R\*),2S\*,3R\*]])-N-[1-(ciclohexilmetil)-2,3-dihidroxi-5-metilhexil]-alfa-[[2-[[[4-metil-1-piperazinil)sulfonil]metil]-1-oxo-3-fenilpropil]-amino]-4-tiazolpropanamida), o sus sales de clorhidrato, o SPP630, SPP635 y SPP800 desarrolladas por Speedel, o RO 66-1132 y RO 66-1168 de la fórmula (A) y (B):



10 sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 El término "aliskiren", si no se define específicamente, debe entenderse como la base libre y como una de sus sales, en especial una de sus sales farmacéuticamente aceptables, con máxima preferencia, una de sus sales de hemifumarato.

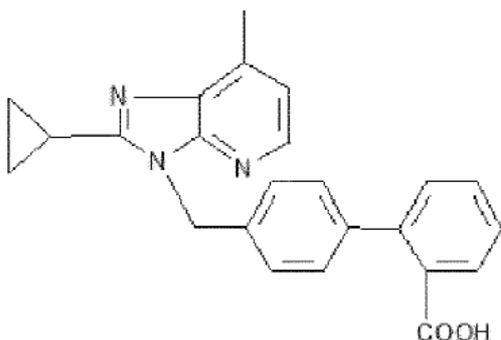
20 La expresión "bloqueador de canales de calcio (CCB)" incluye dihidropiridinas (DHP) y no DHP (por ejemplo, CCB de tipo diltiazem y tipo verapamilo). Los ejemplos incluyen amlodipina, bepridil, diltiazem, felodipina, riosidina, isradipina, lacidipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, verapamil y nivaldipina, y es preferentemente un no DHP representativo seleccionado del grupo que consiste en flunarizina, prenilamina, diltiazem, fendilina, gallopamil, mibefradil, anipamil, tiapamil y verapamil, o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los CCB se pueden usar como medicamentos antihipertensivos, contra angina de pecho o antiarrítmicos.

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

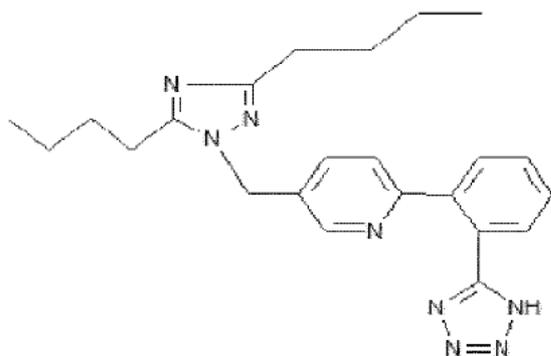
30 La expresión "mímico de ApoA-1" incluye péptidos D4F (por ejemplo, la fórmula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO: 23))

35 Se entiende que un antagonista del receptor de angiotensina II o una de sus sales farmacéuticamente aceptables es un ingrediente activo que se une al subtipo del receptor AT<sub>1</sub> de angiotensina II pero no da como resultado la activación del receptor. Como consecuencia de la inhibición del receptor AT<sub>1</sub>, estos antagonistas pueden emplearse, por ejemplo, como antihipertensivos o para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva.

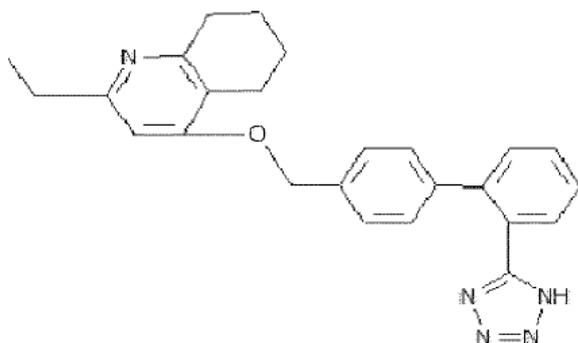
La clase de antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales, esencialmente preferidos son los no peptídicos. Por ejemplo, se pueden mencionar los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en valsartán, losartán, candesartán, 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

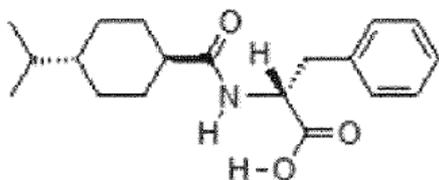


5 y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula



o, en cada caso, una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 10 Los antagonistas preferidos del receptor AT<sub>1</sub> son candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, telmisartán, valsartán. También se prefieren aquellos agentes que se han comercializado, el más preferido es valsartán o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 La expresión “agente antidiabético” incluye potenciadores de la secreción de insulina que promueven la secreción de insulina de las células pancreáticas. Los ejemplos incluyen derivados de biguanida (por ejemplo, metformina), sulfonilureas (SU) (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-cloro-N-[1-pirolidinilamino]carbonil]bencensulfonamida (glucopropiramida)), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepida, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glicidina, glicinamida, fenbutamida y toliicida. Otros ejemplos incluyen derivados de fenilalanina (por ejemplo, nateglinide [N-(trans-4-isopropilciclohexilcarbonil)-D-fenilalanina] (ver documentos EP 196222 y EP 526171) de la fórmula
- 20



- 25 repaglinide [ácido (S)-2-etoxi-4-{2-[[3-metil-1-[2-(1-piperidinil)fenil]butil]amino]-2-oxoetil]benzoico] (cf. documentos EP 589874, EP 147850 A2, en particular el Ejemplo 11 en la página 61, y el documento EP 207331 A1); dihidrato de propionato de calcio (2S)-2-bencil-3-(cis-hexahidro-2-isoindolinilcarbonil)-propionato (por ejemplo, mitglinide (cf. documento EP 507534)); y glimepiride (cf. EP 31058).

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

DPP-IV es responsable de desactivar GLP-1. Más particularmente, DPP-IV genera un antagonista del receptor de GLP-1 y, por lo tanto, acorta la respuesta fisiológica a GLP-1. El GLP-1 es un importante estimulador de la secreción de insulina pancreática y tiene efectos beneficiosos directos en la eliminación de la glucosa.

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

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

La expresión "agonistas de GLP-1" incluye variantes y análogos de GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> que se describen en particular en los documentos US 5.120.712, US 5.118.666, US 5.512.549, 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 Arg<sup>36</sup> se desplaza con Gly en la posición 37 de la molécula de GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> y variantes y análogos de los mismos que incluyen GLN<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37), D-GLN<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37), acetil LYS<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37), LYS<sup>18</sup>-GLP-1 (7-37) y, en particular, GLP-1 (7-37)OH, VAL<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37), GLY<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37), THR<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37), MET<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37) y 4-imidazopropionil-GLP-1. También se da preferencia especial al análogo del agonista de GLP exendina-4, descrito por Greig et al. en *Diabetologia* 1999, 42, 45-50.

También se incluyen en la definición de "agente antidiabético" potenciadores de la sensibilidad a insulina que restauran la función receptora de insulina alterada para reducir la insulinoresistencia y, en consecuencia, mejoran la sensibilidad a la insulina. Los ejemplos incluyen derivados hipoglicémicos tiazolidindiona (por ejemplo, glitazona, (S)-((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2H-1-benzopiran-6-il)metil-tiazolidin-2,4-diona (englitazona), 5-[[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxopropil)-fenil]-metil]-tiazolidin-2,4-diona (darglitazona), 5-[[4-(1-metil-ciclohexil)metoxi]-fenil]metil]-tiazolidin-2,4-diona (ciglitazona), 5-[[4-(2-(1-indolil)etoxi)fenil]metil]-tiazolidin-2,4-diona (DRF2189), 5-[[4-(2-(5-metil-2-fenil-oxazolil)-etoxi)]bencil]-tiazolidin-2,4-diona (BM-13.1246), 5-(2-naftilsulfonil)-tiazolidin-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]-tiazolidin-2,4-diona (AD-5075), 5-[[4-(1-fenil-1-ciclopropancarboxilamino)-bencil]-tiazolidin-2,4-diona (DN-108), 5-[[4-(2-(2,3-dihidroindol-1-il)etoxi)fenil]metil]-tiazolidin-2,4-diona, [3-(4-clorofenil)]-2-propinil]-5-fenilsulfonil]tiazolidin-2,4-diona, 5-[[3-(4-clorofenil)]-2-propinil]-5-(4-fluorofenil-sulfonil)tiazolidin-2,4-diona, 5-[[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)fenil]metil]-tiazolidin-2,4-diona (rosiglitazona), 5-[[4-(2-(5-etil-2-piridil)etoxi)fenil]-metil]tiazolidin-2,4-diona (pioglitazona), 5-[[4-((3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-il)metoxi)-fenil]-metil]-tiazolidin-2,4-diona (troglitazona), 5-[[6-(2-fluorobenciloxi)naftalen-2-ilmetil]-tiazolidin-2,4-diona (MCC555), 5-[[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil]tiazolidin-2,4-diona (T-174) y 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-(4-trifluorometil-bencil)benzamida (KRP297)).

Otros agentes antidiabéticos incluyen, moduladores de la vía de señalización de la insulina, como inhibidores de las proteína tirosina fosfatasa (PTPasas), compuestos miméticos de moléculas no pequeñas antidiabéticos e inhibidores de glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT); compuestos que influyen en una producción de glucosa hepática desregulada, como inhibidores de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-Bpasa), inhibidores de la glucógeno fosforilasa (GP), antagonistas de los receptores del glucagón e inhibidores de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK); inhibidores de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK); inhibidores del vaciamiento gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de las proteínas de desacoplamiento (UCP); agonistas de PPARγ de tipo no glitazona; agonistas duales de PPARα/PPARγ; compuestos antidiabéticos que contienen vanadio; hormonas incretinas, como el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y los agonistas de GLP-1; antagonistas del receptor de imidazolina de células beta; miglitol; antagonistas α<sub>2</sub>-adrenérgicos; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia) una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él, y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados de bloqueadores de receptores β-adrenérgicos tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas del receptor de angiotensina II, tales como bloqueadores AT1; agentes antidiabéticos como los inhibidores de DPPIV (por ejemplo, vildagliptina) y agonistas peptídicos GLP1.

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

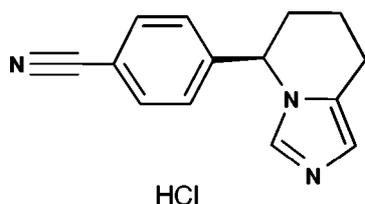
Se entiende que un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un ingrediente activo que tiene la propiedad de inhibir la producción de aldosterona. La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una enzima del citocromo P450 mitocondrial que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, es decir, la conversión de 11-desoxicorticosterona en aldosterona. Se sabe que la inhibición de la producción de aldosterona con los llamados inhibidores de la aldosterona sintasa es una variante exitosa para el

tratamiento de la hipopotasemia, hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, fibrilación auricular o insuficiencia renal. Dicha actividad de inhibición de la aldosterona sintasa es determinada fácilmente por los expertos en la técnica de acuerdo con ensayos estándar (por ejemplo, documento US 2007/0049616).

- 5 La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende inhibidores de la aldosterona sintasa esteroides y no esteroides, siendo estos últimos los más preferidos.

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

- 10 La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales. Un ejemplo de inhibidor no esteroide de la aldosterona sintasa es el enantiómero (+) del clorhidrato de fadrozol (patentes US 4617307 y 4889861) de fórmula



- 15 o, si es apropiado, una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 Los inhibidores de la aldosterona sintasa de utilidad en dicha combinación son compuestos y análogos genérica y específicamente revelados, por ejemplo, en el documento US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones de compuestos y los productos finales de los ejemplos de trabajo. Los inhibidores de la aldosterona sintasa preferidos apropiados para usar en la presente invención incluyen, sin limitación 4-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)-3-metilbenzocarbonitrilo; ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico (4-metoxibencil)metilamida; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5H-imidazo[1,5-a]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo; éster butílico de ácido 5-(4-ciano-2-metoxifenil)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)-2-metoxibenzocarbonitrilo; éster 4-fluorobencílico de ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; éster metílico de ácido 5-(4-ciano-2-trifluorometoxifenil)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; éster 2-isopropoxietílico de ácido 5-(4-ciano-2-metoxifenil)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)-2-metilbenzocarbonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)-3-fluorobenzocarbonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)-2-metoxibenzocarbonitrilo; 3-fluoro-4-(7-metilen-6,7-dihidro-5H-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-il)benzocarbonitrilo; cis-3-fluoro-4-[7-(4-fluoro-bencil)-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,5-a]piridin-5-il]benzocarbonitrilo; 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, su enantiómero (R) o (S); o, si es apropiado, una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 35 El término inhibidores de la aldosterona sintasa también incluye compuestos y análogos descritos en los documentos WO 2008/076860, WO 2008/076336, WO 2008/076862, WO 2008/027284, WO 2004/046145, WO 2004/014914, WO 02001/076574.

- 40 Además, los inhibidores de aldosterona sintasa también incluyen compuestos y análogos revelados en las solicitudes de patente U. S. US 2007/0225232, US 2007/0208035, US 2008/0318978, US 2008/0076794, US 2009/0012068, US 2009/0048241 y en las solicitudes PCT WO 2006/005726, WO 2006/128853, WO 2006/128851, WO 2006/128852, WO 2007/065942, WO 2007/116099, WO 2007/116908, WO 2008/119744 y en la solicitud de patente europea EP 1886695. Los inhibidores de aldosterona sintasa preferidos apropiados para usar en la presente invención incluyen, sin limitación 8-(4-fluorofenil)-5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazina; 4-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)-2-fluorobenzocarbonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)-2,6-difluorobenzocarbonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)-2-metoxibenzocarbonitrilo; 3-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)benzocarbonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)ftalonitrilo; 4-(8-(4-cianofenil)-5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)benzocarbonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazin-8-il)naftalen-1-carbonitrilo; 8-[4-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-5,6-dihidro-8H-imidazo[5,1-c][1,4]oxazina como fue desarrollado por Speedel o en cada caso, su enantiómero (R) o (S); o si es apropiado, una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 55 Los inhibidores de aldosterona sintasa de utilidad en dicha combinación son compuestos y análogos genérica y específicamente revelados, por ejemplo, en los documentos WO 2009/156462 y WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones de compuestos y los productos finales de los ejemplos de trabajo, el objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones. Los inhibidores de aldosterona sintasa preferidos apropiados para combinación en la presente invención incluyen clorhidrato de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-

1H-indol-1-ilmetil)-benzonitrilo, 1-(4-metansulfonil-bencil)-3-metil-2-piridin-3-il-1H-indol, 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1H-indol, éster etílico de ácido 5-(3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-nicotínico, N-[5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-etansulfonamida, éster 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilico de ácido pirrolidin-1-sulfónico, N-metil-N-[5-(1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metansulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-[5-[(2-pirrolidin-1-il-etilamino)-metil]-piridin-3-il]-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metansulfonil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-3-il]-1-metil-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-1-metil-2-[5-[(1-metil-piperidin-4-ilamino)-metil]-piridin-3-il]-1H-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida de ácido morfolin-4-carboxílico, N-[5-(6-cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-etansulfonamida, C,C,C-trifluoro-N-[5-(1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metansulfonamida, N-[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluorometil-bencensulfonamida, N-[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metansulfonamida, N-(5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)butan-1-sulfonamida, N-(1-(5-(4-ciano-3-metoxifenil)piridin-3-il)etil)etansulfonamida, N-((5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)(ciclopropil)metil)etansulfonamida, N-(ciclopropil(5-(1H-indol-5-il)piridin-3-il)metil)etansulfonamida, N-(ciclopropil(5-naftalen-1-il-piridin-3-il)metil)etansulfonamida, [5-(6-cloro-1-metil-1H-pirrol[2,3-b]piridin-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida de ácido etansulfónico y [[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil]-etil-amida de ácido etansulfónico.

El término "bloqueador del receptor 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 colesterol (CETP) de varios ésteres de colesterol y triglicéridos de HDL a LDL y VLDL. Dicha actividad de inhibición de la CETP es determinada fácilmente por los expertos en la técnica de acuerdo con ensayos estándar (por ejemplo, patente US N.º 6.140.343). Los ejemplos incluyen compuestos descritos en la patente US N.º 6.140.343 y patente US N.º 6.197.786 (por ejemplo, éster etílico de ácido [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluorometil-bencil)-metoxicarbonil-amino]-2-etil-6-trifluorometil-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-carboxílico (torcetrapib); compuestos descritos en la patente US N.º 6.723.752 (por ejemplo, (2R)-3-[[3-(4-cloro-3-etil-fenoxi)-fenil]-[[3-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-fenil]-metil]-amino]-1,1,1-trifluoro-2-propanol), compuestos descritos en la solicitud de patente US con número de serie 10/807.838; polipéptidos derivados descritos en la patente US N.º 5.512.548; derivados de rosenonolactona y análogos que contienen fosfato del éster de colesterol descritos en J. Antibiot., 49 (8): 815-816 (1996), y Bioorg. Med. Chem. Lett.; 1951-1954 (1996), respectivamente. Además, los inhibidores de la CETP también incluyen los descritos en los documentos WO 2000/017165, WO 2005/095409, WO 2005/097806, WO 2007/128568, WO 2008/009435, WO 2009/059943 y WO 2009/071509.

La expresión "inhibidor de NEP" se refiere a un compuesto que inhibe la endopeptidasa neutra (NEP) EC 3.4.24.11. Los ejemplos incluyen Candoxatril, Candoxatrilato, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Sampatrilat, Fasidotril, Omapatrilat, Gemopatrilat, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 y éster etílico del ácido (2R,4S)-5-bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionilamino)-2-metil-pentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los inhibidores de la NEP también incluyen derivados dipéptidos sustituidos con fosfono/biarilo, como se describe en la patente US N.º 5.155.100. Los inhibidores de NEP también incluyen el derivado N-mercaptoacil fenilalanina como se describe en la solicitud PCT número WO 2003/104200. Los inhibidores de NEP también incluyen agentes antihipertensivos de doble acción como se describe en los números de solicitud PCT WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen compuestos descritos en la solicitud US número 12/788.794; 12/788.766 y 12/947.029. Los inhibidores de NEP también incluyen los compuestos descritos en los documentos WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 y en las solicitudes provisionales US N.º 61/414171 y 61/414163.

En una realización, la divulgación, con fines de referencia, proporciona un método para activar el receptor de APJ en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él.

En una realización, la divulgación, con fines de referencia, proporciona un método para tratar un trastorno o una enfermedad que responde a la activación del receptor de APJ, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados.

En una realización, las descripciones, con fines de referencia, proporcionan un método para tratar un trastorno o una enfermedad que responde a la activación (agonismo) del receptor de APJ, en un sujeto, en el que el trastorno o la enfermedad se selecciona de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

En una realización, la invención proporciona (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia) un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV

o un bioconjugado de él, para uso como medicamento.

- 5 En una realización, la divulgación, con fines de referencia, proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor de APJ. En otra realización, la invención proporciona (en la medida en que están cubiertas por las reivindicaciones, por lo demás, sólo con fines de referencia) el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una de sus amidas, ésteres o sales o bioconjugados, en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor de APJ, en el
- 10 que dicho trastorno o enfermedad se selecciona de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos, diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas,
- 15 esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

Ejemplificación de la invención: síntesis de péptidos y polipéptidos.

Abreviatura	Definición
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
AC <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
ε-Ahx	Ácido ε-aminohexanoico
AM	Aminometilo
BAL	Ligador de amida estructural
BSA	Albúmina de suero bovino
Boc	<i>ter</i> -Butiloxicarbonilo
Bzl	Bencilo
DCM	Diclorometano
DIC	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N'-Diisopropiletilamina
DMA	N,N'-Dimetilacetamida
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitól
DVB	Divinilbenceno
EDT	Etanditiol
FA	Ácido fórmico
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo

HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBSS	solución salina tamponada de Hank
HCTU	hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-Benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HO At	1-Hidroxí-7-azabenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSA	Suero de albúmina humana
ivDde	(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo
LN	Logaritmo natural
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masa
Nal	2-Naftilalanina
Nle	Norleucina
NMP	N-Metilpirrolidina
Oxyma Pure	2-ciano-2-(hidroxiyimino)acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PE	Piroglutamato
PhP	Fenilprolina
Pip	Ácido piperídico
PG	Grupo protector
Ph	Fenilo
Pol	Soporte polimérico
PS	Poliestireno
ta	temperatura ambiente
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaño
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
tBuOH	ter-Butanol
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

TIS o TIPS	Triisopropilsilano
TPA	Ácido 3-mercaptopropanoico
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Trt	Tritilo
UPLC	Cromatografía líquida de ultrarrendimiento
UV	Ultravioleta

5 Los péptidos se sintetizaron mediante química de Fmoc en fase sólida estándar. Los péptidos se ensamblaron en el sintetizador de péptidos Prelude™ (Protein Technologies, Inc., Tucson, EE. UU.) y en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty (CEM Corporation, Carolina del Norte, EE. UU.). Los péptidos con un ácido carboxílico libre en el término C se sintetizaron a partir de resina de cloruro de 2-clorotritilo-PS (ABCR, Karlsruhe, Alemania o AnaSpec, Inc., California, EE. UU.). Los péptidos con una carboxamida no sustituida en el término C se sintetizaron a partir de la resina Rink-Amida-AM-PS protegida con Fmoc (Merck, Darmstadt, Alemania). Los péptidos con una carboxamida N-monosustituida en el término C se sintetizaron a partir de la resina BAL-AM-PS cargada con aminas (Microcollections EMC, Tubingia, Alemania).

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

- 15 • Columna OBD Waters SunFire Prep C18, 5 µm, 30x100 mm, parte N.º 186002572 (una columna o dos columnas en serie)
- Columna OBD Waters SunFire Prep C18, 5 µm, 30x150 mm, parte N.º 186002797
- Columna OBD T3 de Waters Atlantis Prep, 5 µm, 30x150 mm, parte N.º 186003703
- 20 • Columna OBD Waters XBridge Prep C8, 5 µm, 30x150 mm, parte N.º 186003083
- Machery-Nagel Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250x40 mm, parte N.º 715340.400

25 Las fases móviles consistieron en el eluyente A (0,1% de TFA en H<sub>2</sub>O) y el eluyente B (ACN). Los gradientes se diseñaron según los requisitos específicos del problema de separación. Los productos puros se liofilizaron de ACN/H<sub>2</sub>O.

30 Los productos se analizaron mediante HPLC analítica utilizando detección UV a A = 214 nm y UPLC-MS utilizando ionización por electronebulización.

35 Los péptidos que se ejemplifican en la Tabla 4 se sintetizaron usando los procedimientos generales que se describen a continuación. Los términos N o C no sustituidos están indicados con cursiva *H-* u *-OH*, respectivamente.

Tabla 4:

Ejemplo	Sequence	SEQ ID NO:
Ejemplo 1	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-Pip-nle-a-f-OH	24
Ejemplo 2*	pE-R-P-R-(D-Leu)-S-a-K-G-P-nle-a-f-OH	25
Ejemplo 3*	pE-r-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	26
Ejemplo 4	pE-R-P-R-(D-Leu)-S-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH	27
Ejemplo 5	pE-R-P-R-L-S-Aib-k-G-P-nle-a-f-OH	28
Ejemplo 6*	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-f-OH	29
Ejemplo 7*	pE-R-P-R-L-c(tBu)-H-K-G-P-nle-a-f-OH	30
Ejemplo 8	pE-R-P-R-L-d-H-K-G-P-nle-a-f-OH	31

ES 2 705 323 T3

Ejemplo 9	pE-R-(trans-4-PhP)-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	32
Ejemplo 10	pE-R-P-R-L-(D-Leu)-H-K-G-P-nle-a-f-OH	33
Ejemplo 11*	pE-R-P-R-L-k-H-K-G-P-nle-a-f-OH	34
Ejemplo 12	pE-R-P-R-L-s-H-K-G-P-nle-a-f-OH	35
Ejemplo 13	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-p-f-OH	36
Ejemplo 14	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-(D-Leu)-f-OH	37
Ejemplo 15	pE-R-P-R-L-a-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH	38
Ejemplo 16	pE-R-P-R-L-a-h-K-G-P-nle-a-f-OH	39
Ejemplo 17	pE-R-P-R-L-a-F-K-G-P-nle-a-f-OH	40
Ejemplo 18	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-F-OH	41
Ejemplo 19	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-e-f-OH	42
Ejemplo 20*	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-r-f-OH	43
Ejemplo 21	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-y-OH	44
Ejemplo 22	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-d-OH	45
Ejemplo 23	pE-R-P-R-Cha-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	46
Ejemplo 24	pE-R-P-R-(3,4-Cl <sub>2</sub> -F)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	47
Ejemplo 25	pE-R-P-R-(2-Nal)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	48
Ejemplo 26	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-tic-OH	49
Ejemplo 27	pE-R-P-R-Y(Bzl)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	50
Ejemplo 28	pE-R-P-R-Y-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	51
Ejemplo 29	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	52
Ejemplo 30	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-a-f-OH	53
Ejemplo 31	pE-R-P-R-L-a-H-k-G-P-Nle-a-f-OH	54
Ejemplo 32	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-NH(fenetilo)	55
Ejemplo 33	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-NH <sub>2</sub>	56
Ejemplo 34*	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-P-f-OH	57
Ejemplo 35	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-f-OH	58
Ejemplo 36	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-NH(fenetilo)	59
Ejemplo 37	pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-nle-a-F-OH	60
Ejemplo 38	pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-Nle-a-f-OH	61
Ejemplo 39	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-a-F-OH	62
Ejemplo 40	pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH	63
Ejemplo 41	pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-Nle-P-f-OH	64
Ejemplo 42	pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-Nle-a-F-OH	65

Ejemplo 43	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-(4-fenoxipiperidin-1-ilo)	66
Ejemplo 44	pE-R-P-R-L-abu-H-K-G-P-nle-a-f-OH	67
Ejemplo 45	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-abu-f-OH	68
Ejemplo 46	pE-R-P-R-L-a-f-K-G-P-nle-a-f-OH	69
Ejemplo 47	pE-R-P-R-L-a-L-K-G-P-nle-a-f-OH	70
Ejemplo 48	pE-R-P-R-L-a-a-K-G-P-nle-a-f-OH	71
Ejemplo 49*	pE-R-a-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH	72
Ejemplo 50*	H-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-f-OH	73
Ejemplo 51	pE-R-P-R-L-S-a-K-G-P-nle-a-f-OH	74
Ejemplo 52	pE-R-P-R-L-nva-H-K-G-P-nle-a-f-OH	75
Ejemplo 53	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nva-a-f-OH	76
Ejemplo 54	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-nva-f-OH	77
Ejemplo 55	pE-R-P-R-L-S-f-K-G-P-nle-a-f-OH	78
Ejemplo 56	pE-R-P-R-L-S-h-K-G-P-nle-a-f-OH	79
Ejemplo 57	pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-OH	80
Ejemplo 58	pE-R-P-R-L-A-h-K-G-P-nle-a-f-OH	81
Ejemplo 59	pE-R-P-R-L-a-H-Q-G-P-nle-a-f-OH	82
Ejemplo 60*	pE-R-P-R-L-a-H-E-G-P-nle-a-f-OH	83
Ejemplo 61*	pE-R-P-R-L-v-H-K-G-P-nle-a-f-OH	84
Ejemplo 62	pE-R-P-R-L-a-H-K-D-P-nle-a-f-OH	85
Ejemplo 63*	pE-R-P-R-Cha-nva-H-K-G-P-nle-a-f-OH	86

\*) Ejemplos con un asterisco son ejemplos de referencia

5

Métodos analíticos

1a) HPLC – método analítico A

- columna: Bischoff UHC-640 (53x4.0 mm) con ProntoSil 120-3-C18-H, 3 µm; parte N.º: 0604F185PS030
- eluyente: 0,1% de TFA en agua/eluyente B: 0,1% TFA en ACN
- flujo: 1,5 ml/min
- temperatura: 40 °C
- gradiente

10

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,0	95	5
10	0	100
12,0	0	100
12,2	95	5

1b) HPLC – método analítico B

- Columna: Bischoff UHC–640 (53x4.0 mm) con ProntoSil 120–3–C18–H, 3 µm; parte N.º: 0604F185PS030
  - Eluyente A: 0,1% de TFA en agua/Eluyente B: 0,4% de TFA en ACN/ Eluyente C: MeOH
- 5
- Flujo: 1,5 ml/min
  - Temperatura: 25 °C
  - Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0,0	90	2,5	7,5
9,5	0	25	75
12,0	0	25	75
12,2	90	2,5	7,5

10 1c) HPLC – método analítico C

- Columna: XBridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 µm; parte N.º: 186003612
  - Eluyente A: 0,1% de TFA en agua/Eluyente B: 0,1% de TFA en ACN
- 15
- Flujo: 1,0 ml/min
  - Temperatura: 40 °C
  - Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0,0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

20 2) UPLC–MS – método analítico D

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; parte N.º: 186002350
  - Eluyente A: 0,1% de FA en agua; Eluyente B: 0,1% de FA en ACN
- 25
- Flujo: 0,7 ml/min
  - Temperatura: 40 °C
  - Gradiente:

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

## ES 2 705 323 T3

4,3	0	100
4,6	80	20

### 3) UPLC–HRMS – método analítico E

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; parte N.º: 186002350
- Eluyente A: 0,1% de FA; Eluyente B: 0,1% de FA en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 °C
- Gradiente: 2 al 98% en 4,4 min

### 4) HPLC – método analítico F

- Columna: YMC–Gel ODS–A–C18
- Eluyente A: 0,1% v/v de TFA en agua/ Eluyente B: ACN/Eluyente A, 9/1 v/v
- Elución con gradiente:

Tiempo [min]	Flujo [ml/min]	A [%v/v]	B [%v/v]
0	50	95	5
10	50	95	5
40	50	80	20
45	50	80	20
55	50	75	25
65	50	75	25
75	50	70	30
105	50	70	30

### 5) UPLC–MS–método analítico G

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; parte N.º: 186002350
- Eluyente A: 0,05% de FA + 3,75 mM de acetato de amnio en agua; eluyente B: 0,04% de FA en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 °C
- Gradiente: 2 al 44% en 1,7 min

### 6) UPLC–HRMS – método analítico H

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; parte N.º: 186002350
- Eluyente A: 0,05% de FA + 3,75 mM de acetato de amonio en agua; eluyente B: 0,04% de FA en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 °C
- Gradiente: 2 al 98% en 4,4 min

### 7) UPLC–MS – método analítico I

- columna Waters Acquity UPLC® BEH300 SEC guard column, 4.6x30mm; parte N.º: 186005793

## ES 2 705 323 T3

- Eluyente A: 0,1% de FA en agua; eluyente B: 0,04% de FA en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Gradiente: 50% de B durante 6 min

### 5 8) UPLC–MS – método analítico J

- Waters Acquity UPLC® ProSwift RP–3, 1.7  $\mu$ m, 4.6x50mm; parte N.º: 064298
- Eluyente A: 0,1% de FA en agua; eluyente B: 0,08% de FA en ACN
- Flujo: 2,0 ml/min (3 al 80% de B en 2 min) – flujo 1,8 ml/min
- Temperatura: 40 °C

### 10 • Gradiente: 2 al 98% en 3 min

Los datos analíticos para péptidos de los Ejemplos 1 a 63 se resumen en la Tabla 5 y se generaron usando los métodos analíticos descritos supra.

Péptido	HPLC		Espectrometría de masa				
	$t_R$ [min]	Met.	$[M+2H]^{2+}$ (medido)	$[M+3H]^{3+}$ (medido)	Met.	$[M+2H]^{2+}$ (calc.)	$[M+3H]^{3+}$ (calc.)
Ejemplo 1	3,43	A		496,7	D	744,4	496,6
Ejemplo 2	3,40	A	712,3	475,1	D	712,4	475,3
Ejemplo 3	3,28	A		491,9	D	737,4	491,9
Ejemplo 4	3,40	A	719,2	479,9	D	719,4	479,9
Ejemplo 5	3,44	A	719,2	479,7	D	719,4	479,9
Ejemplo 6	3,40	A		468,2	D	701,9	468,3
Ejemplo 7	3,69	A		521,2	D	781,4	521,3
Ejemplo 8	3,24	A		506,5	D	759,4	506,6
Ejemplo 9	3,65	A		517,2	D	775,4	517,3
Ejemplo 10	3,58	A		505,7	D	758,4	506,0
Ejemplo 11	3,13	A		510,8	D	765,9	511,0
Ejemplo 12	3,26	A		497,1	D	745,4	497,3
Ejemplo 13	3,43	A	750,2	500,3	D	750,4	500,6
Ejemplo 14	3,59	A		505,7	D	758,4	506,0
Ejemplo 15	3,57	A	711,1	474,5	D	711,4	474,6
Ejemplo 16	3,40	A		491,7	D	737,4	491,9
Ejemplo 17	3,88	A	742,2	495,1	D	742,4	495,3
Ejemplo 18	3,43	A		468,1	D	701,9	468,3
Ejemplo 19	3,27	A	766,4		D	766,4	511,3
Ejemplo 20	3,02	A		520,2	D	779,9	520,3
Ejemplo 21	2,82	A	745,3		D	745,4	497,3

ES 2 705 323 T3

Ejemplo 22	2,49	A		481,2	D	721,4	481,3
Ejemplo 23	3,52	A		505,2	D	757,4	505,3
Ejemplo 24	3,65	A		526,0	D	788,4	525,9
Ejemplo 25	3,57	A	779,4	519,8	D	779,4	519,9
Ejemplo 26	3,24	A		495,9	D	743,4	496,0
Ejemplo 27	3,89	A	807,3		D	807,4	538,6
Ejemplo 28	3,12	A		508,5	D	762,4	508,6
Ejemplo 29	3,35	A		491,8	D	737,4	491,9
Ejemplo 30	5,03	B		491,7	D	737,4	491,9
Ejemplo 31	5,22	B	737,4	491,9	D	737,4	491,9
Ejemplo 32	5,47	B	679,9	453,6	D	679,8	453,6
Ejemplo 33	3,17	A	736,7	491,6	D	736,9	491,6
Ejemplo 34	3,37	A		500,6	D	750,4	500,6
Ejemplo 35	3,28	A		468,2	D	701,9	468,3
Ejemplo 36	3,41	A		477,2	D	715,4	477,3
Ejemplo 37	3,59	A	719,3	479,9	D	719,4	479,9
Ejemplo 38	3,41	A	719,4	479,9	D	719,4	479,9
Ejemplo 39	3,27	A		491,9	D	737,4	491,9
Ejemplo 40	3,48	A	719,2	479,9	D	719,4	479,9
Ejemplo 41	3,53	A	732,4	488,6	D	732,4	488,6
Ejemplo 42	3,49	A	719,3	479,9	D	719,4	479,9
Ejemplo 43	3,93	A	708,6	472,6	D	707,9	472,3
Ejemplo 44	7,04	C	744,4	496,6	E	744,9	496,9
Ejemplo 45	7,17	C	744,4	496,6	E	744,9	496,9
Ejemplo 46	7,95	C	742,4	495,3	E	742,9	495,6
Ejemplo 47	7,98	C	725,4	484,0	E	725,9	484,2
Ejemplo 48	7,52	C	704,4	470,0	E	704,8	470,2
Ejemplo 49	7,04	C	724,4	483,3	E	724,8	483,6
Ejemplo 50	6,77	C	646,4	431,3	E	646,8	431,5
Ejemplo 51	6,79	C	712,4	475,3	E	712,8	475,6
Ejemplo 52	7,49	C	751,4	501,3	E	751,9	501,6
Ejemplo 53	6,46	C	730,4	487,3	E	730,8	487,6
Ejemplo 54	7,50	C	751,4	501,3	E	751,9	501,6

Ejemplo 55	7,67	C	750,4	500,6	E	750,9	500,9
Ejemplo 56	6,93	C	745,4	497,3	E	745,9	497,6
Ejemplo 57	7,16	C	754,4	503,3	E	754,9	503,6
Ejemplo 58	7,01	C	737,4	492,0	E	737,9	492,2
Ejemplo 59	7,37	C	737,4	492,0	E	737,9	492,2
Ejemplo 60	7,42	C	737,9	492,3	E	738,3	492,6
Ejemplo 61	7,33	C	751,4	501,3	E	751,9	501,6
Ejemplo 62	7,33	C	766,4	511,3	E	766,9	511,6
Ejemplo 63	8,16	C	771,5	514,6	E	771,9	514,9

Tabla 5

## Procedimientos generales de síntesis

5

## 1) Carga del primer aminoácido en resina de cloruro de 2-clorotritilo y eliminación de Fmoc

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

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

20

La carga de la resina se calcula según la fórmula:

$$\text{Carga [mol/g]} = (A \times V_t \times V) / (d \times e \times V_a \times m)$$

25

(con d: ancho de la cubeta; e = 7800 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

## 2) Síntesis de péptidos en fase sólida.

30

## 2a) Ciclo de síntesis A en el sintetizador Prelude™

35 La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó mediante tratamiento repetitivo con 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realizó 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 de 0,66 M en NMP) seguido mezclando la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente por lo general durante 15 minutos a 4 horas, según los requisitos específicos. Después del lavado con DMA, la etapa de acoplamiento se repitió típicamente de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, se llevó a cabo un tapado final mediante la adición de una mezcla de Ac<sub>2</sub>O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

40

## 2b) Ciclo de síntesis B en el sintetizador Prelude™

45 La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó mediante tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realizó 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.; 0,9 F de solución en NMP) seguido mezclando la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente por lo general durante 15 minutos a 4 horas, según los requisitos específicos. Después del lavado con DMA, la etapa de acoplamiento se repitió típicamente de 1 a 3 veces, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA, se llevó a cabo un tapado final mediante la

adición de una mezcla de Ac<sub>2</sub>O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

### 5 2c) Ciclo de síntesis C en el sintetizador Liberty™

10 La resina se lavó con DMF y DCM. Fmoc se eliminó mediante tratamiento con 20% de piperidina/DMF (típicamente 7 ml por 0,1 mmol dos veces). La resina se lavó con DMF y DCM. El acoplamiento se realizó mediante la adición del Fmoc-aminoácido (5 eq.; solución 0,2 M en DMF), HCTU (5 eq.; solución 0,5 M en DMF), y DIPEA (10 eq.; 2 M solución en NMP) seguido mezclando la suspensión con nitrógeno a 75 ó 50 °C durante, típicamente, 5 a 50 minutos con una potencia de microondas de 0 a 20 vatios, según los requisitos específicos. Después del lavado con DMF, el paso de acoplamiento puede repetirse una vez, dependiendo de los requisitos específicos. La resina se lavó con DMF.

### 15 3) Escisión de la resina con o sin eliminación concomitante de grupos protectores

#### 3a) Método de escisión A

20 La resina (0,1 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante típicamente 1,5–2 h con un 95% de TFA/EDT/TIS ac. (95:2,5:2,5) (2 ml). La solución de escisión se separó por filtración y se añadió solución nueva (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante, típicamente, 0,75–1 h, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió una solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante, típicamente, 0,75–1 h. La solución de escisión se separó por filtración. La resina se enjuagó una vez con 95% de AGT ac. (1 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío.

#### 3b) Método de escisión B

30 La resina (0,1 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h con un 95% de TFA/TIS ac. (97,5:2,5) (2 ml). La solución de escisión se separó por filtración y se añadió solución nueva (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. La solución de escisión se separó por filtración. La resina se enjuagó una vez con 95% de AGT ac. (1 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío.

#### 40 3c) Método de escisión C

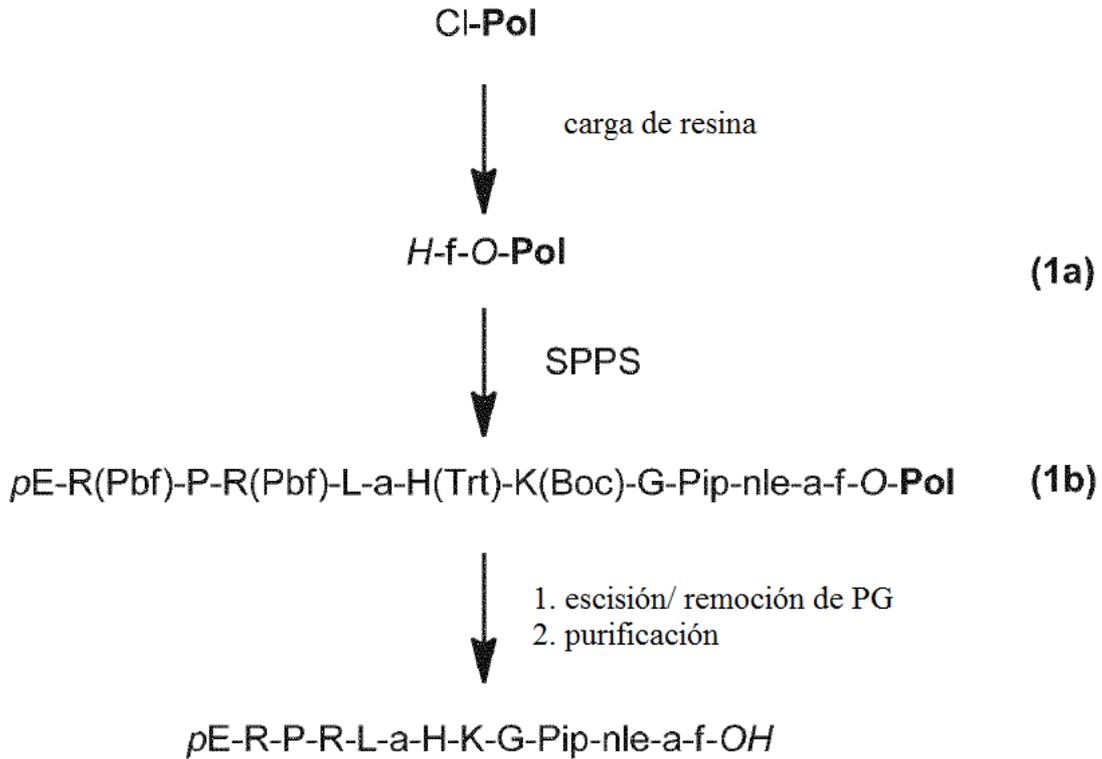
45 Se añadió HFIP/DCM (10:90) (2 ml) a la resina (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La solución de escisión se filtró en iPrOH (0,8 ml). Esta etapa se repitió 3 veces, combinando las soluciones de escisión con la primera solución de escisión que contenía iPrOH directamente. Las soluciones de escisión combinadas se concentraron a sequedad a alto vacío. El residuo se liofilizó en tBuOH/H<sub>2</sub>O (4:1).

#### 3d) Método de escisión D

50 La resina (0,1 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h con un 95% de TFA ac. // TIS/DTT (95:2,5:2,5) (3 mL). La solución de escisión se separó por filtración. La resina se enjuagó una vez con 95% de AFT ac. (1 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (10–15 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió éter dietílico (10 ml) al residuo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se eliminó, se repitió el proceso de lavado dos veces. El sólido se secó a alto vacío.

55 A continuación se describen las síntesis de los ejemplos representativos (los que son ejemplos de referencia se identifican con un asterisco en la Tabla 4).

Ejemplo 1 Síntesis de pE-R-P-R-L-a-H-K-G-Pip-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 24) El ejemplo 1 a continuación describe la SEQ ID NOS 87 y 24, respectivamente, en orden de aparición.



Ejemplo 1

5

- Preparación del Intermediario 1a.

(Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-f-OH, eliminación de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

10

La resina de cloruro de 2-clorotritilo (3,0 g, 4,80 mmol) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-f-OH (1,86 g, 4,80 mmol) en DCM (30 ml) y DIPEA (3,35 ml, 19,2 mmol) por analogía al procedimiento general descrito anteriormente para dar el Intermediario 1a (3,53 g, carga = 0,96 mmol/g).

- Preparación del Intermediario 1b

15

(Ensamble del péptido lineal)

El intermediario 1a (0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 88):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	a	2x15 min	A
2	nle	2x15 min	A
3	Pip	2x15 min	A
4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2x15 min	A
6	H(Trt)	2x15 min	A
7	a	2x15 min	A

8	L	2x15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2x15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	pE	2x15 min	A

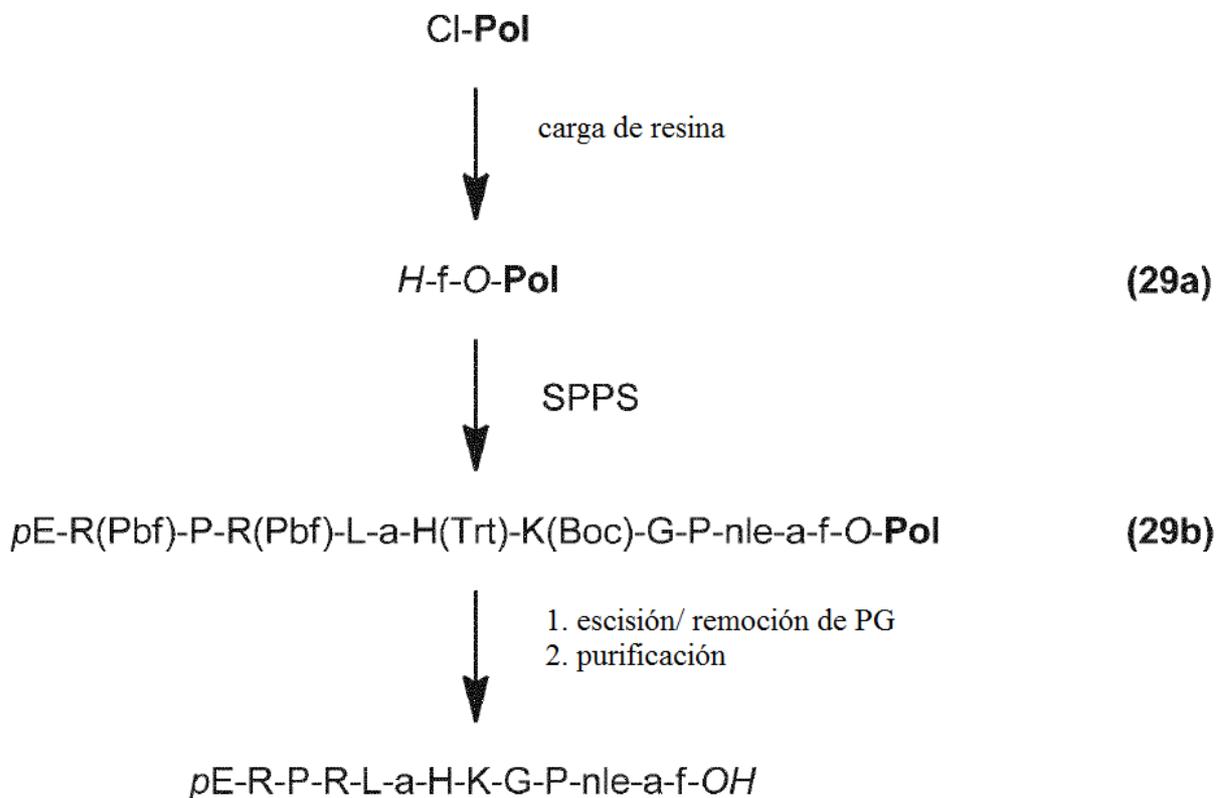
• Preparación del Ejemplo 1

(Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

5 Una mezcla de 95% de TFA/EDT/TIS ac. (95:2,5:2,5) (2 ml) se añadió al Intermediario 1b (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se añadió una solución de escisión nueva (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con un 95% de AFT ac. (1 ml). Las disoluciones combinadas y las soluciones de lavado se vertieron en una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 1 (86,5 mg, 0,044 mmol).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico A: t<sub>R</sub> = 3,43 min) y UPLC-MS (método analítico D; medido: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 496,7; calculada: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 496,6).

20 Ejemplo 29 Síntesis pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 52) El ejemplo 29 a continuación describe la SEQ ID NOS 89 y 52, respectivamente, en orden de aparición.



25 Ejemplo 29

• Preparación del Intermediario 29a.

## ES 2 705 323 T3

(Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-f-OH, eliminación de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

5 La resina de cloruro de 2-clorotritilo (2 g, 3,20 mmol) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-f-OH (992 mg, 2,56 mmol) en DCM (20 ml) y DIPEA (2,236 ml, 12,80 mmol) en analogía con procedimiento general descrito anteriormente para obtener el Intermediario 29a (2,36 g, carga = 0,82 mmol/g).

• Preparación del Intermediario 29b.

10

(Ensamble del péptido lineal)

El intermediario 29a (0,600 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 90):

15

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	a	2x15 min	B
2	nle	2x15 min	B
3	P	2x15 min	B
4	G	2 x 30 min	B
5	K(Boc)	2x15 min	B
6	H(Trt)	2x15 min	B
7	a	2x15 min	B
8	L	2x15 min	B
9	R(Pbf)	4x1 h	B
10	P	2x15 min	B
11	R(Pbf)	4x 1 h	B
12	pE	2x15 min	B

• Preparación del Ejemplo 29

20

(Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

• Una mezcla de 95% de TFA/EDT/TIS ac. (95:2,5:2,5) (10 ml) se agregó al Intermediario 29b (0,6 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de escisión se separó por filtración y se añadió una solución de escisión nueva (10 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió una solución fresca (10 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron en una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (200 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (100 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 29 (538,7 mg, 0,279 mmol).

25

30

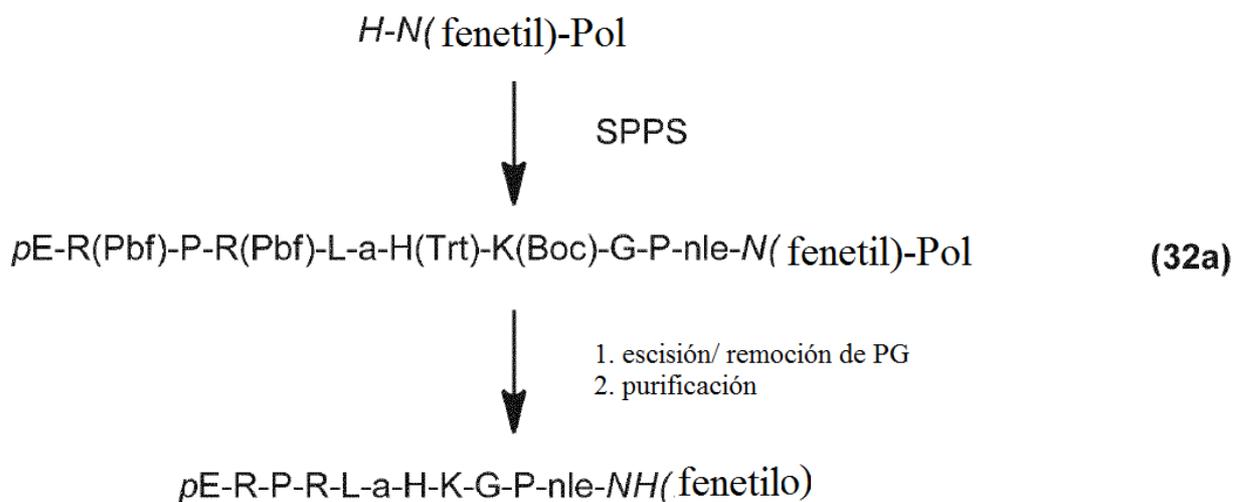
El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico A: tR = 3,35 min) y

UPLC-MS (método analítico D; medido: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 491,8; calculado: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 491,9).

35

Ejemplo 32 Síntesis de pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-NH (fenetilo)

(SEQ ID NO: 55) El ejemplo 32 a continuación describe la SEQ ID NOS 91 y 55, respectivamente, en orden de aparición.



## Ejemplo 32

## 5 • Preparación del Intermediario 32a.

(Ensamble del péptido lineal)

10 La resina de fenetilamina–BAL–PS (167 mg, 0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 92):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	nle	2 x 30 min	B
2	P	2 x 30 min	B
3	G	3 x 1 h	B
4	K(Boc)	2 x 30 min	B
5	H(Trt)	2 x 30 min	B
6	a	2 x 30 min	B
7	L	2 x 30 min	B
8	R(Pbf)	4 x 1 h	B
9	P	2 x 90 min	B
10	R(Pbf)	4x 1 h	B
11	pE	2 x 90 min	B

## Preparación del Ejemplo 32

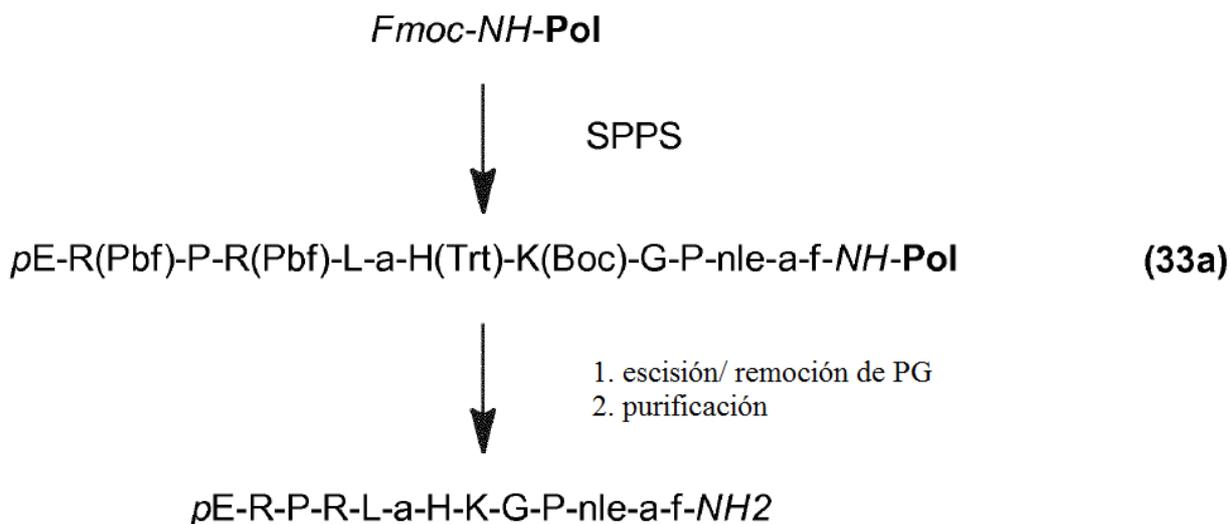
15 (Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

20 Una mezcla de 95% de TFA/EDT/TIS ac. (95:2,5:2,5) (2 ml) se añadió al Intermediario 32a (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se añadió solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente

5 durante 2 h. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con un 95% de AGT ac. (1 ml). Las soluciones de escisión combinadas se vertieron en una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (5 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 32 (37,0 mg, 0,020 mmol).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico B: t<sub>R</sub> = 5,47 min) y UPLC-MS (método analítico D; medido: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 453,6; calculado: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 453,6).

10 Ejemplo 33 Síntesis de pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 56) El Ejemplo 33 siguiente revela las SEQ ID NOS 93 y 56, respectivamente, en orden de aparición.



15 Ejemplo 33

20 • Preparación del Intermediario 33a  
(Ensamble del péptido lineal)

25 La resina Rink-Amida-AM-PS protegida con 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 de la siguiente manera (SEQ ID NO: 94):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	f	2x15 min	A
2	a	2x1 h	A
3	nle	2x15 min	A
4	P	2x15 min	A
5	G	2 x 30 min	A
6	K(Boc)	2x15 min	A
7	H(Trt)	2x15 min	A
8	a	2x15 min	A
9	L	2x15 min	A

10	R(Pbf)	4x 1 h	A
11	P	2 x 30 min	A
12	R(Pbf)	4 x 1 h	A
13	PE	2 x 30 min	A

Preparación del Ejemplo 33

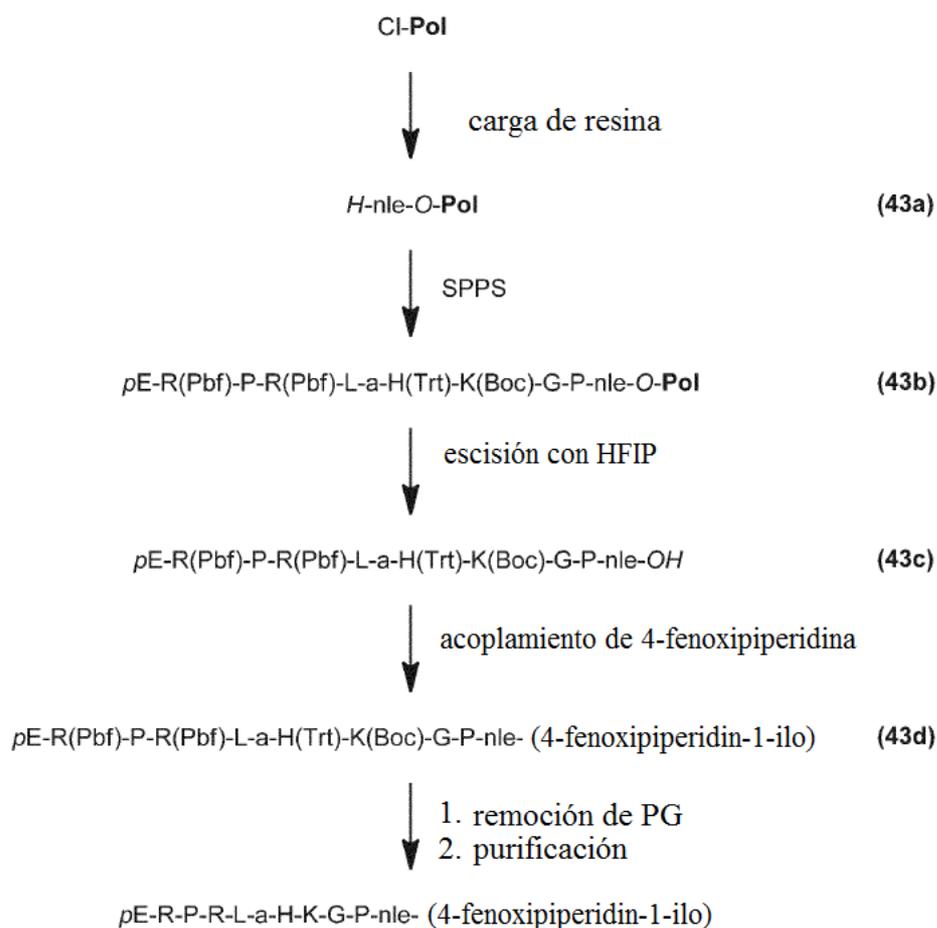
(Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

5 Una mezcla de 95% de TFA/TIS ac. (97,5:2,5) (2 ml) se añadió al Intermediario 33a (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se añadió una solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, luego la solución de escisión se filtró. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min.

10 La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con un 95% de AFT ac. (1 ml). Las soluciones de escisión combinadas se vertieron en una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró. El sólido se secó a alto vacío. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 33 (108,9 mg, 0,055 mmol).

15 El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico A: t<sub>R</sub> = 3,17 min) y UPLC-MS (método analítico D; medido: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 491,6; calculado: [M + 3H]<sup>3+</sup> = 491,6).

20 Ejemplo 43 Síntesis pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle- (4-fenoxipiperidin-1-ilo) (SEQ ID NO: 66) El ejemplo 43 a continuación describe las SEQ ID NOS 95-97 y 66, respectivamente, en orden de aparición.



Ejemplo 43

- Preparación del Intermediario 43a.

(Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-Nle-OH, eliminación de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

5 La resina de cloruro de 2-clorotritilo (300 mg, 0,48 mmol) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-Nle-OH (136 mg, 0,384 mmol) en DCM (3 ml) y DIPEA (0,335 ml, 1,92 mmol) en analogía a la general procedimiento descrito anteriormente para proporcionar el Intermedio 43a (329 mg, carga = 0,99 mmol/g).

- 10 • Preparación del Intermediario 43b

(Ensamble del péptido lineal)

15 El intermediario 43a (0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 98):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	P	2x15 min	A
2	G	2 x 30 min	A
3	K(Boc)	2x15 min	A
4	H(Trt)	2x15 min	A
5	a	2x15 min	A
6	L	2x15 min	A
7	R(Pbf)	4x1 h	A
8	P	2 x 30 min	A
9	R(Pbf)	4x 1 h	A
10	PE	2 x 30 min	A

- Preparación del Intermediario 43c (escisión HFIP de la resina)

20 Se añadió HFIP/DCM (10:90) (2 ml) al Intermediario 43b (0,100 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La solución de escisión se filtró en iPrOH (0,8 ml). Esta etapa se repitió 3 veces, combinando las soluciones de escisión con la primera solución de escisión que contenía iPrOH directamente. Las soluciones de escisión combinadas se concentraron a sequedad a alto vacío. El residuo se liofilizó en tBuOH/H<sub>2</sub>O (4:1) para dar el Intermediario 43c.

25 Preparación del Intermediario 43d

(Acoplamiento de 4-fenoxipiperidina)

30 Una mezcla del Intermediario 43c con HATU (49,4 mg, 0,130 mmol), HOAt (17,7 mg, 0,130 mmol) y 2,6-lutidina (0,233 ml, 2,000 mmol) en NMP (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió 4-fenoxipiperidina (35,0 mg, 0,197 mmol) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 45 min. La mezcla de reacción se concentró a sequedad al vacío para dar el Intermediario 43d.

- 35 • Preparación del Ejemplo 43

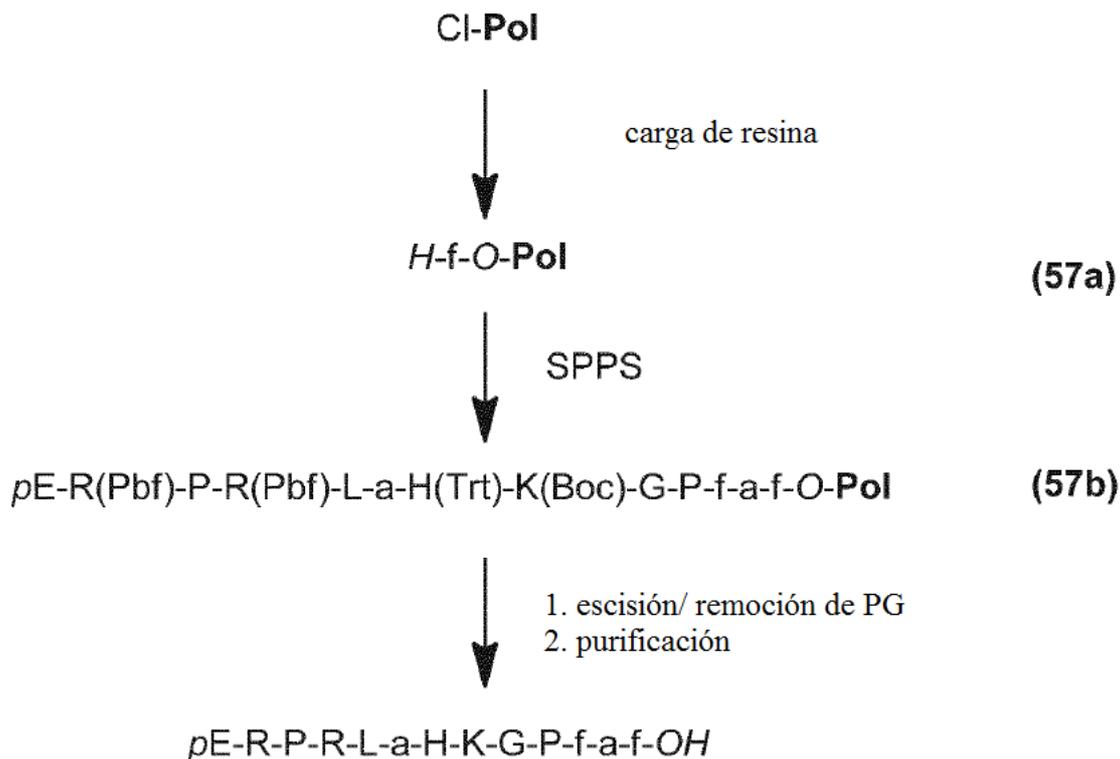
(Eliminación de grupos protectores y purificación).

40 El intermediario 43d se disolvió en un 95% de TFA/EDT/TIS ac. (95:2,5:2,5) (5 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de escisión se vertió en heptano frío/éter dietílico (1:1) (35 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano frío/éter dietílico (1:1) (5 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se secó a alto vacío. El

producto se aisló mediante HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 43 (19,3 mg, 0,010 mmol).

5 El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico A:  $t_R = 3.93$  min) y UPLC-MS (método analítico D; medido:  $[M + 3H]^{3+} = 472,6$ ; calculado:  $[M + 3H]^{3+} = 472,3$ ).

Ejemplo 57 Síntesis de pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-OH (SEQ ID NO: 80) El ejemplo 57 a continuación describe las SEQ ID NOS 99 y 80, respectivamente, en orden de aparición.



10 Ejemplo 57

• Preparación del Intermediario 57a.

15 *(Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-f-OH, eliminación de Fmoc y determinación de la carga de la resina)*

20 La resina de cloruro de 2-clorotritilo (5,0 g, 8,01 mmol) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-f-OH (3,10 g, 8,01 mmol) en DCM (50 ml) y DIPEA (5,59 ml, 32,0 mmol) en analogía a la general procedimiento descrito anteriormente para proporcionar el Intermediario 57a (5,87 g, carga = 0,887 mmol/g).

• Preparación del Intermediario 57b.

25 *(Ensamble del péptido lineal)*

El intermediario 57a (0,100 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 100):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia del microondas	Ciclo de síntesis
1	a	1 x 7,5 min	50	20	C

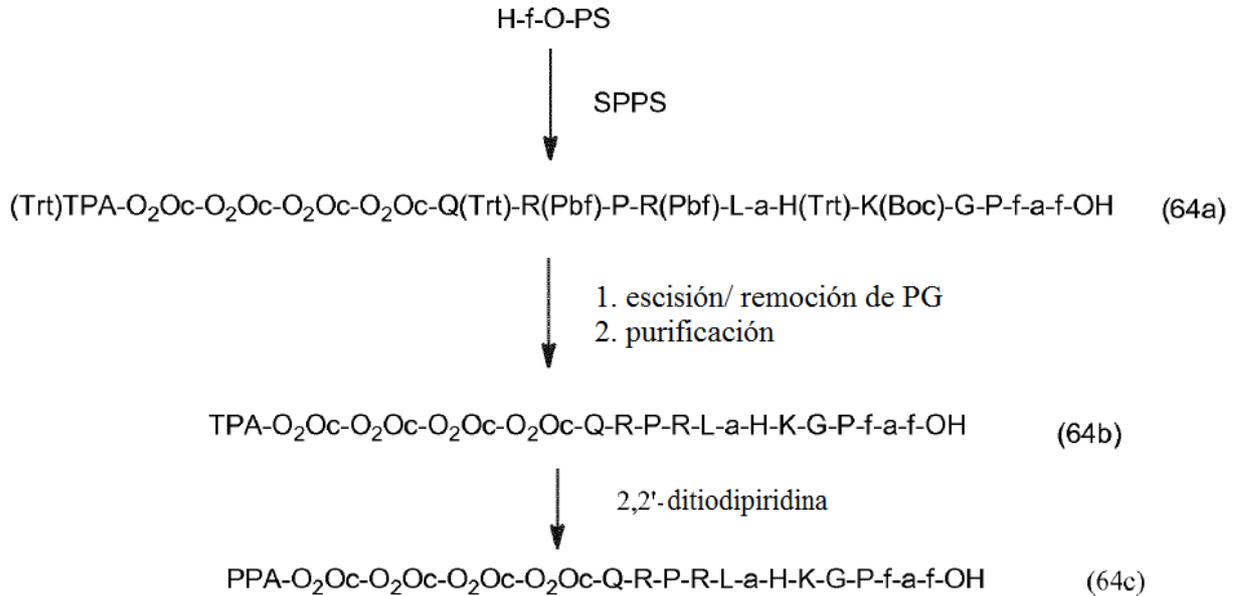
2	f	1 x 7,5 min	50	20	C
3	P	1 x 7,5 min	50	20	C
4	G	1 x 7,5 min	50	20	C
5	K(Boc)	1 x 7,5 min	50	20	C
6	H(Trt)	1x2 min	50	0	C
		1x 4 min	50	25	
7	a	1 X 7,5 min	50	25	C
8	L	1 x 7,5 min	50	25	C
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	C
		2 x 7,5 min	50	25	
10	P	1 x 7,5 min	50	25	C
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	C
		2 x 7,5 min	50	25	
12	pE	1 x 7,5 min	50	25	C

• Preparación del Ejemplo 57

(Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

- 5 Una mezcla de 95% de TFA/EDT/DTT ac. (95:2,5:2,5) (3 ml) se agregó al Intermediario 57b (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con un 95% de AFT ac. (1 ml). Las disoluciones combinadas y las soluciones de lavado se vertieron en una mezcla de heptano frío/éter dietílico (1:1) (11 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió éter dietílico (10 ml) al residuo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se eliminó por vertido. El proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó a alto vacío. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Ejemplo 57 (59 mg, 0,030 mmol).
- 10
- 15 El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (método analítico C:  $t_R = 7,16$  min) y UPLC-MS (método analítico E; medido:  $[M + 3H]^{3+} = 503,3$ ; calculado:  $[M + 3H]^{3+} = 503,6$ ).
- 20 Esta sal de TFA aislada bruta se disolvió en agua (15 mL de agua/mmol de polipéptido) y se convirtió en la sal de acetato usando una resina de intercambio iónico del tipo base fuerte en su forma de hidróxido [Intercambiador iónico III, base fuerte, (forma <sup>-</sup>OH 0,9 mmol/ml), Merck-Darmstadt, Alemania, número de catálogo; 1.04767.0500, (25 eq)], y el producto de sal de acetato puro se aisló mediante liofilización.
- 25 La estequiometría de la sal se evaluó basándose en el análisis del contenido acético (cromatografía iónica) y el contenido de agua y se determinó que oscilaba entre 1:3 y 1:4 (polipéptido:acetato).
- 30 Los otros ejemplos fueron sintetizados por analogía:
- Los Ejemplos 2 a 28 se sintetizaron por analogía al Ejemplo 1.
  - Los Ejemplos 30 y 31 se sintetizaron en analogía con el Ejemplo 29.
  - Los Ejemplos 34 a 42 se sintetizaron por analogía al Ejemplo 33.
  - Los Ejemplos 44 a 56 y 58 a 63 se sintetizaron por analogía al Ejemplo 57.
- 35 Ejemplo 64: Albúmina-TPA-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-Q-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-OH (SEQ ID NO: 101) en donde TPA:ácido 3-mercaptopropanoico

Etapa 1: Síntesis del Intermediario 64c (PPA-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-O<sub>2</sub>Oc-Q-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-OH) (SEQ ID NO: 102). El Ejemplo siguiente revela las SEQ ID NOS 103-104 y 102, respectivamente, en orden de aparición.



5

• Preparación del Intermediario 64a.

10

(Ensamble del péptido lineal)

H-f-O-PS (1,0 mmol) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera (SEQ ID NO: 105):

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia del microondas	Ciclo de síntesis
1	a	1 x 7,5 min	50	20	C
2	f	1 x 7,5 min	50	20	C
3	P	1 x 7,5 min	50	20	C
4	G	1 x 7,5 min	50	20	C
5	K(Boc)	1 x 7,5 min	50	20	C
6	H(Trt)	1 x 2 min	50	0	C
		1 x 4 min	50	25	
7	a	1 x 7,5 min	50	20	C
8	L	1 x 7,5 min	50	25	C
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	C
		2 x 7,5 min	50	25	
10	P	1 x 7,5 min	50	25	C
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	C

## ES 2 705 323 T3

		2 x 7,5 min	50	25	
12	Q(Trt)	1 x 7,5 min	50	25	C
13	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25	C
14	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25	C
15	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25	C
16	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25	C
17	(Trt)TPA	1 x 7,5 min	50	25	C

### • Preparación de Intermediario 64b

(Escisión de la resina con la eliminación concomitante del grupo protector y luego la purificación)

5 Una solución hecha de 3,09 g de DTT y 3 mL de tioanisol en 25 mL de TFA/TIPS/Agua (95:2,5:2,5) se añadió al Intermediario 64a (1,0 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con 95% de AGT ac. (5 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron en éter dietílico frío (80 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió éter dietílico (80 ml) al residuo. La suspensión se agitó en vórtex durante 3 min, se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El proceso de lavado se repitió 3 veces. El sólido se secó a alto vacío. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Intermediario 64b en forma de un polvo blanco (235 mg, 84 μmol).

15 El producto puro se analizó mediante UPLC–MS (método analítico G; medido: [M + 2H]<sup>2+</sup> = 1097,5; calculado: [M + 2H]<sup>2+</sup> = 1097,8).

Preparación del Intermediario 64c: PPA–O2Oc–O2Oc–O2Oc–O2Oc–Q–R–P–R–L–a–H–K–G–P–f–a–f–OH (SEQ ID NO: 102), en donde PPA: ácido 3–(2–piridilditio)propiónico

20 Una mezcla del Intermediario 64b (76 mg, 29 μmol), 2,2'–ditiodipiridina (19 mg, 86 μmol) en ACN (1 ml) se agitó a 25 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH y se filtró. La solución se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para proporcionar el Intermediario 64c en forma de un polvo blanco (28 mg, 10 μmol).

25 El producto puro se analizó mediante UPLC–MS (método analítico G; medido: [M + 2]<sup>2+</sup> = 1152,5; calculado: [M + 2]<sup>2+</sup> = 1152,3).

Etapa 2: destapado de albúmina • destapado con TCEP

30 A una solución de albúmina (500 mg, Aldrich, polvo liofilizado, de suero humano) en 10 ml de tampón PBS 1x en un tubo de 15 ml, se agregó una solución de clorhidrato de TCEP (1,074 mg en agua purificada de grado biológico) una vez. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se desalificó y se lavó con dos filtros centrífugos Amicon Ultra–4 (30K MWCO). Los filtros se giraron a 4K g durante 40 minutos y el filtrado se descartó. Se agregaron 3 ml de agua purificada de grado biológico a cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 3 veces. HSA destapadase disolvió en agua (aproximadamente 20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se liofilizó para dar un polvo cristalino (500 mg).

40 El producto puro se analizó mediante UPLC–MS (método analítico I; medido: 66439,0; esperado: 66437).

• Determinación del número de grupos tiol libres en HSA destapada.

45 A una solución de este HSA destapada(2 mg) en 400 μL de PBS pH 7,4 en un tubo de 2 ml se le añadió una solución de ácido 6–maleimidohexanoico (13 μg) en agua. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. UPLC–MS (método analítico J) mostró solo formación de monoadductos, medido: 66649,0; esperado: 66648.

• Destapado con TDT

50 A una solución de albúmina (400 mg, Aldrich, polvo liofilizado, de suero humano) en 5 ml de tampón PBS 1x en un tubo de 15 ml, se agregó una solución de DTT (0,232 μl, 2 mg/ml en agua purificada de grado biológico) una vez. La

- 5 solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, luego se desalificó y se lavó con veinte filtros centrífugos Amicon Ultra-0,5 (10K MWCO). Los filtros se giraron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se descartaron. Se añadió agua purificada de grado biológico a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 6 veces. HSA destapada se disolvió en agua (aproximadamente 20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se liofilizó para dar un polvo cristalino (376 mg).
- El producto puro se analizó mediante UPLC-MS (método analítico J; medido: 66438,5; esperado: 66437).
- 10 • Determinación del número de grupos tiol libres en HSA destapada.
- A una solución de esta HSA decapada (3 mg) en 400 µL de PBS, pH 7,4 en un tubo de 2 ml, se agregó una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (25 pg) en agua. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La UPLC-MS (método analítico J) mostró solo formación de monoadductos, medido: 66608,0; esperado: 66606.
- 15 • Destapado con cisteína
- A una solución de albúmina (120 mg, Aldrich, polvo liofilizado, de suero humano) en 1 ml de tampón PBS 50 mM, pH 8,0 en 2 ml. Se añadió tubo de cisteína (10,94 mg) una vez. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se desalificó y se lavó con dos filtros centrífugos Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se giraron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se descartaron. Se añadió agua purificada de grado biológico a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 5 veces. La HSA destapada se disolvió en agua (4 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml y se liofilizó para dar un polvo cristalino (108 mg).
- 20 El producto puro se analizó mediante UPLC-MS (método analítico J; medido: 66439; esperado: 66437).
- 25 • Determinación del número de grupos tiol libres en HSA destapada.
- A una solución de esta HSA destapada (3 mg) en 500 µL de PBS pH 7,4 en un tubo de 2 ml se le añadió una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (15 g) en agua. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La UPLC-MS (método analítico J) mostró solo formación de monoadductos, medido: 66608,0; esperado: 66606.
- 30 Etapa 3: Albúmina-TPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-a-f-OH (SEQ ID NO: 1011)
- Una solución de HSA destapada (100 mg) en tampón PBS (6 ml) se trató con una solución de Intermediario 64c (7,8 mg en agua). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se desalificó y se lavó con 4 filtros centrífugos Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se hicieron girar a 13K g durante 10 minutos y los filtrados se desecharon. Se añadió agua purificada de grado biológico a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 13K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 6 veces. El conjugado se disolvió en agua (4 ml en total). La solución se transfiere a un tubo Falcon de 15 ml y se liofiliza para dar un polvo cristalino (90,5 mg).
- 35 El producto puro se analizó mediante UPLC-MS (método analítico I; medido: 68630; esperado: 68629).
- 40 Se ha encontrado que el polipéptido en los ejemplos anteriores tiene valores de EC<sub>50</sub> en el intervalo de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1100 nM para la potencia del receptor de APJ. Se ha encontrado que los polipéptidos en los ejemplos a continuación tienen una estabilidad en plasma superior a 2 minutos, superior a 5 minutos, superior a 10 minutos, superior a 20 minutos, superior a 50 minutos y superior a 60 minutos.
- 45 Se puede observar que los polipéptidos de la invención o sus bioconjugados son útiles como agonistas del receptor de APJ y, por lo tanto, útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones que responden a la activación del receptor de APJ como se describe en las reivindicaciones.
- 50 Además, se ha demostrado que la vida media de estos péptidos se prolonga aún más formando un bioconjugado que comprende un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV con un resto que prolonga la vida media, tal como la albúmina sérica humana.
- 55
- 60

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que activa el receptor de APJ que tiene la siguiente fórmula: (SEQ ID NO: 10):

5



en donde:

10

X1 es el término N del polipéptido y es pE;

X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3.4-Cl<sub>2</sub>-F o Nal;

15

X7 es un D-aminoácido, L, H o Aib;

X8 es K;

X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;

20

X12 está ausente o un D-aminoácido seleccionado de a, f, p, e, abu, nva, y D-Leu;

X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13

es un D-aminoácido;

25

en donde:

abu es ácido 2-amino-butírico;

30

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

35

Nal es L-(naftil)alanina;

D-Nva es D-norvalina;

Aib es ácido α-aminoisobutírico;

40

Cha es (S)-p-ciclohexilalanina;

pE es ácido L-piroglutámico;

45

3,4-Cl<sub>2</sub>-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina; y

Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;

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

50

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 11):



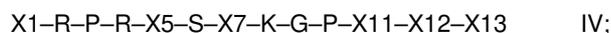
en donde X6 es a;

55

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

3. Un polipéptido que activa del receptor de APJ que tiene la fórmula IV (SEQ ID NO: 12):

60



en donde

65

X1 es el término N del polipéptido y es pE;

X5 es L;

- X7 es un D-aminoácido o Aib;
- 5 X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;
- X12 está ausente, P o un D-aminoácido;
- X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13 es un D-aminoácido; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.
- 10 4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde X7 es Aib o un D-aminoácido seleccionado de a, f y h (SEQ ID NO: 14); o una de sus amidas, ésteres o sales.
- 15 5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde X13 está ausente o es un D-aminoácido seleccionado de f, y, d, y D-Tic (SEQ ID NO: 16), o una de sus amidas, ésteres o sales, en donde D-Tic es ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico.
6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 seleccionado de:
- 20 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-p-f-OH (SEQ ID NO: 36)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-(D-Leu)-f-OH (SEQ ID NO: 37)  
 pE-R-P-R-L-a-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 38)  
 pE-R-P-R-L-a-h-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 39)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-F-OH (SEQ ID NO: 41)
- 25 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-e-f-OH (SEQ ID NO: 42)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-y-OH (SEQ ID NO: 44)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-d-OH (SEQ ID NO: 45)  
 pE-R-P-R-Cha-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 46)  
 pE-R-P-R-(3,4-Cl<sub>2</sub>-F)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 47)
- 30 pE-R-P-R-(2-Nal)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 48)  
 pE-R-P-R-Y(Bzl)-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 50)  
 pE-R-P-R-Y-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 51)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 52)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 53)
- 35 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-NH(fenetilo) (SEQ ID NO: 55)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 56)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-f-OH (SEQ ID NO: 58)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-NH(fenetilo) (SEQ ID NO: 59)  
 pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-nle-a-F-OH (SEQ ID NO: 60)
- 40 pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-Nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 61)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-Nle-a-F-OH (SEQ ID NO: 62)  
 pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 63)  
 pE-R-P-R-L-S-Aib-K-G-P-Nle-a-F-OH (SEQ ID NO: 65)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-(4-fenoxipiperidin-1-ilo) (SEQ ID NO: 66)
- 45 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-abu-f-OH (SEQ ID NO: 68)  
 pE-R-P-R-L-a-f-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 69)  
 pE-R-P-R-L-a-L-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 70)  
 pE-R-P-R-L-a-a-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 71)  
 pE-R-P-R-L-S-a-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 74)
- 50 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nva-a-f-OH (SEQ ID NO: 76)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-nva-f-OH (SEQ ID NO: 77)  
 pE-R-P-R-L-S-f-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 78)  
 pE-R-P-R-L-S-h-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 79)  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-f-a-f-OH (SEQ ID NO: 80)
- 55 o una amida, un éster o una sal del polipéptido.
7. Un polipéptido que activa el receptor de APJ seleccionado de:
- 60 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-Pip-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 24);  
 pE-R-P-R-(D-Leu)-S-Aib-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 27);  
 pE-R-P-R-L-S-Aib-k-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 28);  
 pE-R-P-R-L-d-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 31);  
 pE-R-(trans-4-PhP)-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 32);  
 pE-R-P-R-L-(D-Leu)-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 33);  
 pE-R-P-R-L-s-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 35);
- 65 pE-R-P-R-L-a-F-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 40);  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-G-P-nle-a-tic-OH (SEQ ID NO: 49);

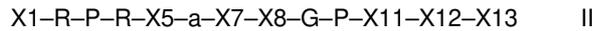
pE-R-P-R-L-a-H-k-G-P-Nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 54);  
 pE-R-P-R-L-abu-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 67);  
 pE-R-P-R-L-nva-H-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 75);  
 pE-R-P-R-L-A-h-K-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 81); y  
 pE-R-P-R-L-a-H-Q-G-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 82);  
 pE-R-P-R-L-a-H-K-D-P-nle-a-f-OH (SEQ ID NO: 85);  
 o una amida, un éster o una sal del polipéptido,  
 en donde Pip es ácido pipercolico, abu es ácido 2-amino-butírico,  
 4-PhP es 4-fenilprolina.

5  
10

8. Un bioconjugado o su multímero que comprende:

a. un péptido o polipéptido que activa el receptor de APJ que tiene la siguiente fórmula (SEQ ID NO: 10):

15



en donde:

20

X1 es el término N del polipéptido y es Q;  
 X5 es L, Cha, D-L, F, Y, Y(Bzl), 3.4-Cl2-F o Nal;  
 X7 es un D-aminoácido, L, H o Aib;

25

X8 es K;  
 X11 es D-Nle, Nle, f o D-Nva;

30

X12 está ausente o es un D-aminoácido seleccionado de a, f, p, e, abu, nva, y D-Leu;  
 X13 es el término C y está ausente, F o un D-aminoácido; y al menos uno de X11, X12 y X13  
 es un D-aminoácido;

35

en donde:  
 abu es ácido 2-amino-butírico;

40

Nle es L-norleucina;  
 D-Nle es D-norleucina;  
 Nal es L-(naftil)alanina;

45

D-Nva es D-norvalina;  
 Aib es ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico;

50

Cha es (S)-p-ciclohexilalanina;  
 pE es ácido L-piroglutámico;  
 3.4-Cl2-F es (S)-3,4-diclorofenilalanina; y

55

Y(Bzl) es L-bencil-tirosina;  
 o una de sus amidas, ésteres o sales, y

60

b. un resto que prolonga la vida media;  
 en donde dicho péptido o polipéptido y resto que prolonga la vida media se ligan en forma covalente, opcionalmente  
 por medio de un ligador, con el término N del péptido o polipéptido.

65

9. El bioconjugado o un multímero de los mismos, de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el resto que prolonga  
 la vida media es una albúmina sérica humana.

10. Un polipéptido o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar como un medicamento.
- 5 11. Un polipéptido o una amida, un éster de una de sus sales o un bioconjugado de él de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso, a través de la activación del receptor de APJ, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, reestenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de líquidos,
- 10 diabetes (incluida la diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) o preeclampsia.
12. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una amida, un éster o una de sus sales, o un bioconjugado de él de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, y uno o más coagentes terapéuticamente activos.
- 15 13. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el coagente se selecciona de inótropos, bloqueadores del receptor beta adrenérgico, inhibidores de la HMG-Co-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), bloqueadores de los canales de calcio (CCB), antagonistas de la endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, imitadores de la ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores del receptor de aldosterona, bloqueadores del receptor de la endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de la CETP, anticoagulantes, relaxina, BNP (nesiritide) y/o un inhibidor de NEP.
- 20 14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o una amida, un éster o una de sus sales, o su bioconjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
- 25