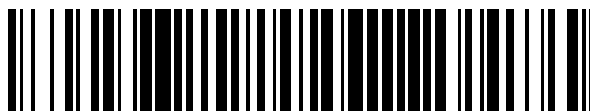


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 137**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015** **PCT/NL2015/050191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015** **WO15147641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015** **E 15720489 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019** **EP 3122764**

54 Título: **Análogos de apelina cíclica**

30 Prioridad:

25.03.2014 EP 14161533

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

08.07.2019

73 Titular/es:

LANTHIOPEP B.V. (100.0%)
Rozenburglaan 13B
9727 DL Groningen, NL

72 Inventor/es:

RINK, RICK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 719 137 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

Análogos de apelina cíclica

- 5 La invención se relaciona con el campo de la farmacología. En particular, se relaciona con nuevos análogos de apelina y con los usos terapéuticos de los mismos.

10 El gen de la apelina codifica una preproteína de 77 aminoácidos que se procesa para generar péptidos bioactivos que consisten en 36, 17 o 13 aminoácidos (apelina-36, apelina-17 y apelina-13, respectivamente). Las dos isoformas principales son apelina-13 y apelina 36.

15 El receptor de apelina, APJ, es un receptor acoplado a proteína G (GPCR). La señalización APJ típica estimulada por apelina implica la activación de proteínas G sensibles a la toxina pertussis (Gi o Go), lo que lleva a una producción reducida de AMPc, así como a la activación de la fosfolipasa C, proteína quinasa C y quinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular. Véase O'Carroll et al. (J. of Endocrinology (2013) 219, R13-R35) para una visión general reciente sobre la señalización de apelina. Además, la estimulación de APJ con apelina conduce al reclutamiento de β -arrestinas (Lee et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 395: 185-189). Según lo revisado por Ma y Pei (J. Cell Science (2007) 120, 213-218), las arrestinas forman un grupo de proteínas de andamiaje que no solo regulan la desensibilización y la internalización del receptor, sino que también activan vías de señalización alternativas independientes de proteína G corriente abajo de GPCRs. Por ejemplo, en respuesta a la activación de ciertos GPCR, las β -arrestinas se translocan desde el citoplasma al núcleo y se asocian con cofactores de transcripción tal como p300 y proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) en los promotores de genes objetivo para promover la transcripción. También interactúan con reguladores de los factores de transcripción, tal como I κ B α y MDM2, en el citoplasma y regulan la transcripción indirectamente. Esta regulación de la transcripción mediada por β -arrestina parece jugar un papel importante en el crecimiento celular, la apoptosis y la modulación de las funciones inmunes.

30 La apelina y la APJ se expresan ampliamente en homogenados de órganos de animales en un patrón compartido con angiotensinógeno y el receptor de angiotensina. Apelina está ampliamente distribuida en el CNS y en la periferia, especialmente en el corazón, riñón, pulmón y glándulas mamarias. Se detectó inmunorreactividad de tipo apelina en los adipocitos, mucosa gástrica, endotelios y células de Kupffer en el hígado.

35 Apelina-13 es el ligando endógeno del receptor APJ, que activa este receptor acoplado a la proteína G con un valor de EC₅₀ de 0.37 nM (los valores de EC₅₀ para apelina-17 y apelina-36 son 2.5 y 20 nM, respectivamente). Actúa principalmente en la periferia y en el sistema nervioso central, y desempeña funciones importantes en la regulación de la función cardiovascular, la homeostasis de líquidos, la hipertensión y la sensibilidad a la insulina. A diferencia de apelina-36, apelina-13 bloquea pobremente la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana en las células.

40 La unión de apelina-13 y 36 a APJ inhibe la producción de AMPc inducida por forskolina y media la activación independiente de Ras de quinasas reguladas extracelulares (ERK). La unión de apelina-13 y -36 conduce a la internalización de APJ, que se recicla a la superficie celular externa (Zhou, N et al., 2003 APJ. Virology 307, 22-36).

45 La administración de apelina exógena altera la función cardiovascular, la presión sanguínea, la temperatura corporal, los fluidos corporales y los comportamientos involucrados en la ingesta de alimentos y la ingesta de agua. Varias enfermedades cardiovasculares humanas están acompañadas por cambios en la expresión de apelina y/o APJ en tejidos cardiovasculares. En estudios en animales, la apelina ejerce vasodilatación y acciones inotrópicas positivas. La apelina activa el y, en consecuencia, estimula la liberación de óxido nítrico de las células endoteliales vasculares. La apelina también mejoró el pronóstico de la función cardíaca bajo condiciones patológicas, como la isquemia experimental y la lesión por reperfusión (Lee, D. K., George, R. y O'Dowd, B. F. (2006) Trends in Pharmacological Sciences 27, 190-194). Sin embargo, estos efectos cardiovasculares son de corta duración debido a la corta vida en circulación del péptido Apelina.

55 Los intentos para mejorar la semivida de las apelinas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento WO2012/125408 divulga una apelina pegilada que comprende una o más moléculas de polietilén glicol (PEG) operativamente unidas a al menos un residuo de aminoácido en el extremo N de una apelina. Se encontró que la Apelina pegilada tiene una vida circulante prolongada y un efecto inotrópico, en relación con una Apelina no pegilada. Otro enfoque para mejorar la vida media de las apelinas implica la generación de variantes cíclicas. Por ejemplo, se han realizado grandes variantes cíclicas (1 a 12; 1 a 7; y 7 a 12) de apelina 12 que mostraron efectos inhibitorios dependientes de la dosificación contra la acumulación de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) inducida por forskolina, y los efectos máximos fueron casi abolidos por el tratamiento con toxina pertussis (PTx) (Hamada, J. (2008) International Journal of Molecular Medicine. 22, 547-552). Sin embargo, todos los análogos cíclicos tuvieron varios órdenes de magnitud de actividad reducida en comparación con pE-apelina13

65 El documento WO2013/111110 divulga miméticos de apelina sintéticos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Las variantes incluyen estructuras cíclicas en las que las cadenas laterales de aminoácidos están unidas entre sí mediante un ya sea un enlace de monosulfuro, disulfuro o una amida.

Por consiguiente, existe una necesidad de análogos de Apelina mejorados para mejorar su vida en circulación y otras características beneficiosas. En particular, sería deseable que el análogo tenga una mayor vida media combinada con una actividad biológica diferencial, por ejemplo que puede usarse para modular selectivamente diferentes vías activadas a través del receptor APJ. Por ejemplo, sería interesante tener análogos que muestren una señalización significativa (agonística) a través de la actividad de AMPc, pero que sean menos potentes que los agonistas endógenos para inducir el reclutamiento de β -arrestina, la internalización del receptor APJ y/o la regulación negativa, de tal manera que se mejore la actividad biológica. A la inversa, en vista de la regulación de la transcripción mediada por la β -arrestina y su papel en el crecimiento celular, la apoptosis y la modulación de las funciones inmunes, las variantes que son estímulos más potentes del reclutamiento de arrestina también proporcionan interesantes agonistas sesgados. En particular, los efectos sobre el reclutamiento de beta arrestina y la estimulación Gi/0 pueden conducir a diferentes efectos y/o efectos con diferentes cinéticas en la célula. Arrestina no parece actuar a través de la ruta Akt, mientras que Gi/0 lo hace. La activación de ERK dependiente de la proteína G parece ser rápida y transitoria y puede ser bloqueada por la toxina pertussis o los inhibidores de la PKA. Por el contrario, la activación de ERK dependiente de beta-arrestina tiene un inicio más lento y una duración más prolongada, y es sensible al agotamiento de las beta-arrestinas pero no a la inhibición de Gi/PKA o la pérdida de Gs (Lan Ma 2006). La estimulación Gi/0 de MAPK y los efectos de andamios de arrestina en MAPK afectan de manera diferente la distribución de ERK en el citoplasma/núcleo con consecuencias para el destino celular.

Se encontró sorprendentemente que al menos algunos de los objetivos anteriores se alcanzan mediante la provisión de nuevos compuestos de apelina cíclica que se caracterizan por un puente tioéter que abarca 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos para producir un polipéptido limitado espacialmente que tiene actividad biológica. Por ejemplo, la introducción de un puente tioéter en la apelina dio como resultado un aumento de 2 a 8 veces en la estabilidad en plasma, mientras se mantenía la actividad de señalización. Además, se identificaron varias variantes interesantes que muestran ya sea un aumento o una disminución significativos en la señalización a través del AMPc en relación con la arrestina en comparación con la apelina nativa.

Por consiguiente, la invención proporciona un análogo de apelina que consiste en un polipéptido de fórmula general X1-X2-X3-X4-X5-X6-X8-X9-X10-X11-X13-X13-X, que comprende un puente de Lantionina de la estructura Ala-S-Ala o un puente de metilLantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu, en el que

X1 está ausente

X2 pGlu;

X3 es Arg

X4 es Pro, Pro-(me)Lan,

X5 es Arg, (me)Lan, Arg-(me)Lan,

X6 es Leu, (me)Lan, Leu-(me)Lan,

X7 es Ala, (me)Lan,

X8 es His, (me)Lan,

X9 es Lys, (me)Lan, Lys-(me)Lan,

X10 es Gly, (me)Lan,

X11 es Pro, (me)Lan,

X12 es Met, (me)Lan, Met-(me)Lan

X13 está ausente o seleccionado de Pro, Dhb, (me)Lan,

X14 es el terminal C y está ausente o es Phe a menos que X13 esté ausente;

en la que Dhb significa dehidrobutirina (me)Lan significa Lan o meLan, en la que Lan denota la mitad de terminal N o C de una Lantionina (Ala-S-Ala) y meLan denota la mitad de terminal N o C de una metilLantionina (Abu-S-Ala o Ala-S-Abu); con la condición de que:

(i) el análogo contiene hasta dos residuos de Ala;

(ii) la secuencia X4 a X13 contiene un par de meLan o un par de Lan que juntos forman un puente (metil)Lantionina;

y

(iii) en la que dicho puente (metil)Lantionina es del tamaño i, i + 3; i, i + 4, i, i + 5, o i, i + 6, preferiblemente i, i + 3 o i, i + 4; en el que "i" denota el residuo (por ejemplo, X4) del aminoácido de terminal N involucrado en la formación del puente tioéter y en el que "i + ..." denota el residuo (por ejemplo, X7 en el caso de i + 3) del aminoácido de terminal C involucrado en la formación del puente tioéter;

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

Se encontró que una estructura de puente (metil)lantionina de tamaño i, i + 1 proporciona poca protección proteolítica mientras que el puente i, i + 2 es difícil de hacer. I, i + 5 y i, i + 6 son sustratos menos ideales para la actividad de la ciclasa, pero confieren mejor resistencia proteolítica. En una realización preferida, dicho puente (metil)Lantionina es del tamaño i, i + 3 o i, i + 4, de manera que hay dos o tres residuos debajo del anillo.

Esta invención se refiere a variantes de (metil)lantionina de apelina en las que el puente tioéter se forma ya sea mediante (i) la sustitución de dos aminoácidos de la secuencia natural; (ii) reemplazo de un aminoácido de la secuencia natural e inserción de un aminoácido en el cualquier terminal N o C del reemplazo; o (iii) dos aminoácidos insertados.

Una variante que contiene lantionina se caracteriza por la estructura Ala-S-Ala, que está formada por dos partes "Lan" presentes (ya sea por reemplazo o inserción) en el tramo X4-X13. Una variante que contiene metillantionina se caracteriza por la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu que está formada por dos partes "meLan" presentes (ya sea por reemplazo o inserción) en el tramo X4-X13. Por lo tanto, la anotación Lan par o meLan par comprendida en X4-X13 se refiere a la estructura final, ciclada. Biosintéticamente, los residuos Lan y meLan se originan a partir de residuos de cisteína, serina y treonina. Primero, los residuos de serina y treonina seleccionados se deshidratan enzimáticamente para formar residuos de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente. Luego, la adición nucleofílica de una cisteína tiol a un residuo Dha o Dhb en la forma de Michael forma un residuo Lan o MeLan, respectivamente. Estas modificaciones establecen un enlace covalente entre un tiol cisteína y el carbono β de otro residuo, formando así un puente tioéter. Más específicamente, la estructura Ala-S-Ala puede originarse a partir de Dha y Cys, en la que Cys puede estar localizada terminalmente en N o C de Dha. La estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu de Dhb y Cys o Cys y Dhb, respectivamente.

El documento US2013/0196899 proporciona análogos cíclicos sintéticos de apelina y métodos para proporcionarlos. Los anillos en los análogos de US2013/0196899 están formados por aminoácidos que forman un enlace disulfuro o amida a través de su cadena lateral o terminal, respectivamente. Sin embargo, los disulfuros y los enlaces amida son químicamente menos estables que los enlaces tioéter. Además, durante la formación de lantionina, la estereoquímica juega un papel, haciendo que la estructura peptídica resultante sea más definida y más específica para el receptor. Además, los puentes tioéter dentro de las lantioninas son puentes más cortos que los puentes disulfuro y que los enlaces cruzados de amida. Como una consecuencia, las lantioninas inducen estructuras que son diferentes de las inducidas por entrecruzamientos de disulfuros y/o amida.

Hamada et al. (2008, Int. J. of Mol. Med. 22: 547-552) divulga la síntesis de análogos cíclicos del fragmento de apelina RPRLSHKGPMPF (apelina-12) en el que el extremo N está conectado al terminal C, o en el que la cadena lateral de Lys en la posición 7 forma un anillo con cualquier residuo de terminal N o C. En este caso también se producen enlaces ciclourea, que son menos estables que los puentes tioéter. Adicionalmente, las variantes de Hamada et al. no tienen terminales N- libres y/o C- libres.

En un análogo de polipéptido, cada uno de X1 a X14 debe elegirse de un conjunto de opciones seleccionadas.

X1 denota el terminal N del polipéptido y está ausente o es Lys-Phe-Arg-Arg. En un aspecto preferido, X1 está ausente.

X2 está ya sea ausente o seleccionado de pGlu, Gln y Ala. Preferiblemente, X1 está ausente y X2 es Glu o pGlu (piroglutamato). En un aspecto específico, X1 es pGlu. La introducción de piroglutamato en el terminal N puede proteger el análogo contra la hidrólisis de terminal N. El ácido piroglutámico (también conocido como PCA, 5-oxoprolina, ácido pídólico o piroglutamato por su forma básica) es un derivado de aminoácido poco común en el que el grupo amino libre de ácido glutámico o glutamina se cicla para formar una lactama. Es un metabolito en el ciclo del glutatión que se convierte en glutamato por la 5-oxoprolinasa. El piroglutamato se encuentra en muchas proteínas, que incluyen la bacteriorrodopsina. El ácido glutámico de terminal N y los residuos de glutamina pueden ciclarse espontáneamente para convertirse en piroglutamato.

X3 es un residuo de aminoácido básico seleccionado de Arg y Ala, de los cuales se prefiere Arg.

X4 es seleccionado del grupo que consiste en Pro, Ala, Pro-(me)Lan, Pro-Dhb, Ala-Dhb o Ala-(me)Lan; como Pro, Ala, Pro-(me)Lan o Ala-(me)Lan. En una realización, X4 es Pro o Ala, de los cuales se prefiere Pro. En otro aspecto, X4 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de Pro-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X4 puede ser Pro-Lan o Ala-Lan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X4 es Pro-meLan o Ala-meLan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan (por ejemplo (me)Lan, His-(me)Lan o Ala-(me)Lan en la posición X8) es una metillantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu.

X5 es Arg, Ala, (me)Lan, Dhb, Arg-(me)Lan, Arg-Dhb, Ala-Dhb o Ala-(me)Lan; por ejemplo X5 es Arg, Ala, (me)Lan, Arg-(me)Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X5 es Arg o Ala, de los cuales se prefiere Arg. En otro aspecto, X5 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de (me)Lan, Arg-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X5 puede ser Lan, Arg-Lan o Ala-Lan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan (por ejemplo Lan, Lys-Lan o Ala-Lan en la posición X9) es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X5 es meLan, Arg-meLan o Ala-meLan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan es una metillantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu.

X6 es seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ala, (me)Lan, Dhb, Leu-(me)Lan, Leu-Dhb, Ala-Dhb y Ala-(me)Lan. Por ejemplo X6 es Leu, Ala, (me)Lan, Leu-(me)Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X6 es Leu o Ala, de los cuales se prefiere Leu. En otro aspecto, X6 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de (me)Lan, Leu-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X6 puede ser Lan, Leu-Lan o Ala-Lan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan (por ejemplo Lan o Ala-Lan en la posición X10) es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X6 es meLan, Leu-meLan o Ala-meLan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan es una metilantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu.

X7 es seleccionado del grupo que consiste en Ala, (me)Lan, Dhb, Ala-(me)Lan, Ala-Dhb, Dhb-Ala y (me)Lan-Ala. Por ejemplo, X7 es Ala, (me)Lan, Ala-(me)Lan o (me)Lan-Ala. Preferiblemente, X7 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de (me)Lan, Ala-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X7 puede ser Lan, Ala-Lan o Lan-Ala, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan (por ejemplo Lan, Pro-Lan o Ala-Lan en la posición X11) es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X7 es meLan, Ala-meLan o meLan-Ala, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan es una metilantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu. En un aspecto específico, X7 es (me)Lan, opcionalmente en combinación con cualquier X9 que es Lys-(me)Lan, o X10 que es (me)Lan o Ala-(me)Lan, X11 que es (me)Lan o Ala-(me)Lan, X12 que es (me)Lan, Met-(me)Lan o Ala-(me)Lan.

X8 es seleccionado del grupo que consiste en His, Ala, (me)Lan, Dhb, His-(me)Lan, His-Dhb, Ala-Dhb y Ala-(me)Lan. Por ejemplo, X8 es His, Ala, (me)Lan, His-(me)Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X8 es His o Ala, de los cuales se prefiere His. En otro aspecto, X8 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de (me)Lan, His-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X8 puede ser Lan, His-Lan o Ala-Lan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan (por ejemplo Lan, Met-Lan o Ala-Lan en la posición X12) es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X8 es meLan, His-meLan o Ala-meLan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan es una metilantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu. Se prefiere X8 que consiste en o que comprende His.

X9 es seleccionado del grupo que consiste en Lys, Ala, (me)Lan, Dhb, Lys-(me)Lan, Lys-Dhb, Ala-Dhb y Ala-(me)Lan. Por ejemplo, X9 es Lys, Ala, (me)Lan, Lys-(me)Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X9 es Lys o Ala, de los cuales se prefiere Lys. En otro aspecto, X9 está involucrado en la formación del puente tioéter y es seleccionado de (me)Lan, Lys-(me)Lan y Ala-(me)Lan. X9 puede ser Lan, Lys-Lan o Ala-Lan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de Lan (por ejemplo Lan, Pro-Lan y Ala-Lan en la posición X13) es una lantionina de la estructura Ala-S-Ala. Alternativamente, X9 es meLan, Lys-meLan o Ala-meLan, de tal manera que el puente tioéter formado con un segundo residuo de meLan es una metilantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu. Se prefiere X9 que consiste en o que comprende Lys. En un aspecto específico, X9 es Lys-(me)Lan.

X10 es seleccionado del grupo que consiste en Gly, Ala, (me)Lan, Dhb, Ala-Dhb y Ala-(me)Lan. Por ejemplo, X10 es Gly, Ala, (me)Lan o Ala-(me)Lan. En una realización, X10 es Gly. En otra realización, X10 es meLan.

X11 es Pro, Ala, (me)Lan, Pro-Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X11 es Pro o (me)Lan.

X12 es Met, Ala, (me)Lan, Met-(me)Lan o Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X12 es Met.

X13 está ya sea ausente o seleccionado de Pro, Dhb, (me)Lan, Pro-(me)Lan y Ala-(me)Lan. Preferiblemente, X13 es seleccionado de Pro, Dhb, (me)Lan, Pro-(me)Lan y Ala-(me)Lan, más preferiblemente de Pro y (me)Lan. En un aspecto específico, X13 es Pro. En otro aspecto específico, X13 es Dhb.

X14 es el terminal C y está ya sea ausente o se selecciona de Phe y Ala, a menos que X13 esté ausente. En una realización, X14 y X13 están ausentes. En otra realización, X14 es Phe o Ala, de los cuales se prefiere Phe. En un aspecto específico, la variante peptídica está amidada en el extremo C, por ejemplo, en la que X14 es una Phe amidada (Phe-NH₂).

En una realización específica, X1 está ausente y la secuencia X2-X3-X4-X5-X6 es pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu. Se obtuvieron muy buenos resultados con la secuencia X7-X8-X9-X10 siendo (me)Lan-His-Lys-(me)Lan, preferiblemente meLan-His-Lys-meLan, o con la secuencia X7-X8-X9-X10 siendo (me)Lan-His-Lys-(me)Lan-Gly, preferiblemente meLan-His-Lys-meLan-Gly.

En otras variantes, la secuencia X4-X5-X6-X7-X8 es Pro-(me)Lan-Arg-Leu-Ala-(me)Lan o Pro-Arg-(me)Lan-Arg-Leu-Ala-(me)Lan.

Las variantes a manera de ejemplo incluyen aquellas en las que se prefieren los cuatro residuos de terminal C que consisten en la secuencia Pro-Met-Pro-Phe. Sin embargo, en otras variantes útiles, X14 está ausente o Ala, por ejemplo, en la que el terminal C es Pro-Met-Pro, Pro-Met-Pro-Ala. En otra realización más, X11-X12-X13-X14 es (me)Lan-Met-Pro-Phe.

También se abarca una amida, un éster o una sal de dicho polipéptido.

Preferiblemente, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, tal como cualquier sal no venenosa, por ejemplo, una sal con un ácido inorgánico, una sal con un ácido orgánico, una sal con una base inorgánica, una sal con una base orgánica y una sal con aminoácido. Como se usa aquí, "sal aceptable" se refiere a sales que retienen la actividad deseada del oligopéptido o compuesto equivalente, pero preferiblemente no afectan negativamente a la actividad del oligopéptido u otro componente de un sistema en el que usa el oligopéptido. Ejemplos de tales sales son las sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares. Las sales también pueden formarse con ácidos orgánicos tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido alginico, ácido poliglutamico y similares. Las sales pueden formarse con cationes metálicos polivalentes tal como el zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel y similares o con un catión orgánico formado a partir de N,N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una sal de tannato de zinc).

En una realización, un análogo cíclico como se proporciona aquí tiene una potencia del receptor APJ similar a apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización, el agonista de APJ cíclico de la presente invención tiene una concentración media efectiva máxima (EC₅₀) de menos de 100 nM cuando mide la inhibición de la producción de AMPc y/o la estimulación del reclutamiento de detención y/o cualquier otra medición de la señalización medida de APJ. En otra realización, el EC₅₀ es menor que 50 nM, preferiblemente menor que 25 nM y más preferiblemente menor que 15 nM. En otra realización específica, el análogo de la presente invención tiene un EC₅₀ de menos de 10 nM.

El análogo preferiblemente tiene una estabilidad en plasma superior a la apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización, la mejora de la estabilidad del plasma es al menos 2 veces más alta que la observada para las apelinas conocidas. La estabilidad puede caracterizarse por la vida media (t₅₀), el tiempo en el que se conserva el 50% de la actividad enzimática inicial. En una realización, el análogo de la invención tiene una vida media (t₅₀) en plasma de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una vida media de al menos 10 minutos, preferiblemente al menos 40 minutos y más preferiblemente al menos 60 minutos. En una realización específica, t₅₀ en plasma es más de 1 hora, preferiblemente más de 2 horas, lo más preferido al menos 4 horas.

Los análogos de apelina específicos de la presente invención se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Análogo	Estructura
Apel3c	QRPmeLanRLAmeLanKGMPF
Apel3cS	QRPLanRLALanKGMPF
Apel4a	QRPRmeLanLameLanKGMPF
ApeT4cS I*,	QRPLanLAHLanGMPF
pApel3c	pERPmeLanRLAmeLanKGMPF
pApel3cS	pERPLanRLALanKGMPF
pApel4a	pERPRmeLanLameLanKGMPF
pApeT4cS I*	pERPLanLAHLanGMPF
ApeM5	QRPRLmeLanHKmeLan PMPF
pApeM5	pERPRLmelanHKmelanPMPF
pApeM5T	pERPRLmeLanHKmeLanPMDhbF
Apel5cS I*	QRPRLlanAHKlanPMPF
Apel5cS II**	QRPRLlanAHKlanPMPF
Apel5dS I*	QRPRLlanAHKlanGMPF
Apel5dS II**	QRPRLlanAHKlanGMPF
pApel5cS I*	pERPRLlanAHKlanPMPF
pApel5cS II**	pERPRLlanAHKlanPMPF
pApel5dS I*	pERPRLlanAHKlanGMPF

pEApeI5dS II**	pERPRLanAHKlanGPMPF
ApeM6	QRPRLmeLanHKmeLanGPMPF
pEApeM6	pERPRLmeLanHKmeLanGPMPF
amidated pEApeM6	pERPRLmeLanHKmeLanGPMPF-NH2
ApeM6deltaF	QRPRLmeLanHKmeLanGPMP
pEApeM6deltaF	pERPRLmeLanHKmeLanGPMP
ApeM6S	QRPRLLanHKlanGPMPF
pEApeM6S	pERPRLlanHKlanGPMPF
pEApeM7	pERPRLmeLanHKGmeLanPMPF
pEApeM7S I*	pERPRLlanHKGLanPMPF
pEApeM7S II**	pERPRLlanHKGLanPMPF
pEApeT8cS	pERPRLAHLanGPMLanF
ApeM7S I*	QRPRLLanHKGLanPMPF
ApeM7S II**	QRPRLLanHKGLanPMPF
ApeT8cS	QRPRLAHLanGPMLanF
ApeM8S	QRPRLLanHKGLanMPF
pEApeM8	pERPRLmeLanHKGmeLanMPF
ApeM9S	QRPRLLanHKGPLanPF
ApeM12S	QRPRLLanHKGPLanMPF
pEApeM9S	pERPRLlanHKGPLanPF
pEApeM12S	pERPRLlanHKGPLanMPF
Ape17M2	KFRRQRPRLmeLanHKmeLanPMPF
Ape17M3	KFRRQRPRLmeLanHKmeLanGPMPF
Ape17M4	KFRRQRPRLLanAHKlanPMPF
Ape17M5	KFRRQRPRLLanAHKlanGPMPF
Ape17M6	KFRRQRPRLLanHKGLanPMPF
Ape17M7	KFRRQRPRLAHLanGPMLanF
ApeM26	QRPRLLanHKGPMLanF
ApeM27	QRPRLLanHKGPMLanPF
pEApeM26	pERPRLlanHKGPMLanF
pEApeM27	pERPRLlanHKGPMLanPF
* Isómero más frecuente resultante de la ciclación espontánea	
** Isómero menos frecuente resultante de la ciclación espontánea.	

También se proporciona un método para proporcionar un análogo de apelina de acuerdo con la invención. Los enlaces intramoleculares entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en un péptido cíclico pueden formarse químicamente o enzimáticamente. Los análogos de la apelina cíclica se preparan ventajosamente utilizando una célula huésped que comprende una o más enzimas biosintéticas para la síntesis de lantipéptidos o lantibióticos (Arnison et al. 2013 Nat Prod Rep 30, 108-160). Lantipéptidos y lantibióticos (un subgrupo de lantipéptidos con actividad antimicrobiana) son pequeños péptidos que contienen puentes internos que resultan de la formación de residuos de (metil)lantanina o lisinoalanilo (revisado en McAuliffe et al., FEMS Microbiol. Rev. 25,285-308 (2001)). La lantanina (Lan) y la metillantanina (MeLan) resultan de la deshidratación de serina a deshidroalanina (Dha) y de treonina a deshidrobutirina (Dhb), respectivamente, y la formación de enlaces tioéter que resultan de la interacción de estos aminoácidos con un residuo de cisteína dentro del mismo péptido. Ejemplos bien conocidos de lantibióticos son nisina, subtilina, Pep5 y epiderminina. Los lantibióticos se sintetizan ribosomalmente como prepéptidos

inactivos, que contienen un péptido líder amino terminal y un propéptido carboxilo terminal. El péptido líder es necesario para la interacción del precursor lantibiótico con enzimas lantibióticas. El péptido líder se escinde proteolíticamente del propéptido ya sea dentro de la célula productora o durante o después del transporte fuera de la célula. Los genes biosintéticos del lantipéptido se agrupan juntos y reciben el nombre de locus lan. LanA es el gen que codifica el propéptido lantibiótico, lanB es el gen que codifica una enzima responsable de la deshidratación de serina o treonina y lanC es el gen que codifica una enzima responsable de la formación del ciclo. En algunos casos, las actividades de LanB y LanC se unen en una enzima bifuncional codificada por lanM. Los genes lanP y lanT codifican las enzimas involucradas en el procesamiento y/o transporte de los prepéptidos.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para la preparación enzimática de un análogo de apelina cíclica de acuerdo con la invención, que comprende:

proporcionar una célula huésped que comprende:

- una molécula de ácido nucleico que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder terminal N encontrado con el péptido precursor de un lantipéptido o lantibiótico y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un análogo de apelina, por lo que dicho primer y segundo fragmento están dentro del mismo marco abierto de lectura de dicha molécula de ácido nucleico;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima capaz de deshidratar la serina y/o la treonina;
- opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína transportadora; y
- una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima capaz de inducir la formación de lantionina o metillantionina.

Cualquier péptido líder encontrado con el precursor de un lantipéptido/lantibiótico es adecuado para uso en un método para la preparación de análogos de péptidos cíclicos de acuerdo con la invención. Ejemplos de tales péptidos líderes son los péptidos líderes de nisina, subtilina, Pep5 y epiderminina. En una realización preferida, se usa un péptido líder de nisina. La enzima capaz de deshidratar la serina y/o la treonina preferiblemente es una LanB, tal como NisB, PepB, SpaB, o un equivalente funcional de los mismos. La enzima capaz de inducir la formación de lantionina y/o metillantionina es un LanC, como NisC, PepC, SpaC, o un equivalente funcional de los mismos. En una realización, la deshidratación de serina y/o treonina y lantionina y/o metillantionina son inducidas por la misma enzima, una LanM, tal como, CinM, LtnM, LctM, o un equivalente funcional de la misma.

La formación de lantionina entre dehidroalanina y cisteína es energéticamente posible a temperatura ambiente y también puede ocurrir espontáneamente, sin la participación de una enzima LanC o LanM.

Por lo tanto, en una realización, se proporciona un método para la preparación enzimática de un análogo de apelina cíclica de acuerdo con la invención que comprende un puente (metil)lantionina que comprende:

a) proporcionar una célula huésped que comprende:

- una molécula de ácido nucleico que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder terminal N encontrado dentro del péptido precursor de un lantipéptido/lantibiótico y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un análogo de apelina, por lo que dicho primer y segundo fragmento están dentro del mismo marco de lectura abierto de dicha molécula de ácido nucleico;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima capaz de deshidratar la serina y/o la treonina;
- (opcionalmente) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína transportadora; y

b) permitir la traducción de dicho primer ácido nucleico;

c) recolectar dicho análogo de péptido, preferiblemente recolectando el péptido ya sea desde el medio o después de la lisis de la célula huésped del citoplasma.

Por lo tanto, un resto de (metil)lantionina puede ser instalado posttraduccionalmente en un péptido precursor lineal a través de la deshidratación enzimática de serina y treonina en los residuos α - β -insaturados 2,3-didehidroalanina (Dha) y (Z) 2,3-didehidrobutirina (Dhb), respectivamente, seguido por la adición intramolecular de cisteína tiol de tipo Michael para producir el entrecruzamiento tioéter. Este enfoque que utiliza la maquinaria biosintética puede reconstituirse in vitro o en huéspedes bacterianos.

En una realización, un método comprende establecer una célula huésped con un plásmido que codifica para las enzimas modificadoras de lantipéptidos que deshidratan serinas/treoninas y acoplan los deshidroaminoácidos formados a la cisteína y, opcionalmente, que codifican un transportador lantipeptídico y con un plásmido que codifica para un constructo compuesto de un péptido líder lantipeptídico terminal N y un análogo de apelina terminal C.

Como se detalló anteriormente, se forma una (metil)lantionina entre las cadenas laterales de una serina o treonina deshidratada, es decir, una dehidroalanina o una dehidrobutirina, respectivamente, y una cisteína. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de apelina que (cuando se cicla) comprende al menos una

lantionina o metilantionina, necesita tener un codón de ácido nucleico que codifica una serina (TCT, TCC, TCA, TCG, AGT o AGC) o una treonina (ACT, ACC, ACA o ACG) y un codón de ácido nucleico que codifica una cisteína (TGT o TGC) en las dos posiciones de aminoácidos dentro del análogo peptídico que formarán la lantionina o la metilantionina.

En una realización, el segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un análogo de apelina codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en

QRPTRLACKGPMMPF, QRPSRLACKGPMMPF, QRPRTLACKGPMMPF, QRPSLAHCGPMMPF, QRPRLTHKCPMPF,
 QRPRLSAHKCPMPF, QRPRLSAHKCPMPF, QRPRLSAHKCGPMMPF, QRPRLSAHKCGPMMPF,
 QRPRLTHKCGPMMPF, QRPRLTHKCGPMMPF-NH2, QRPRLTHKCGMP, QRPRLSHKCGPMMPF,
 QRPRLTHKGCPMPF, QRPRLSHKGCPMPF, QRPRLSHKGCPMPF, QRPRLAHSGPMCF, QRPRLSHKGCPMPF,
 QRPRLTHKGCPMPF, QRPRLSHKGCPMPF, QRPRLSHKGCPMPF, KFRQRPRLTHKCPMPF,
 KFRQRPRLTHKCGPMMPF, KFRQRPRLSAHCMPMPF, KFRQRPRLSAHCMPMPF,
 KFRQRPRLSHKGCPMPF, KFRQRPRLAHSGPMCF, QRPRLSHKGPMCF y QRPRLSHKGPMCPF.

En caso de que el residuo terminal N del péptido sea glutamina (Q), el método preferiblemente comprende además la conversión de Q a pE de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Rink et al. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61 (2010) 210-218).

Con el fin de recoger un análogo de péptido cíclico o un análogo de péptido deshidratado que todavía no se ha ciclizado en el medio, se prefiere especialmente que esté presente una proteína transportadora si la célula huésped es una bacteria Gram positiva. Preferiblemente, dicha proteína transportadora es una LanT, tal como NisT, o un equivalente funcional de la misma. En *Escherichia coli* no se requiere la presencia de un transportador y la recolección del análogo peptídico preferiblemente se realiza después de la ruptura de las células.

Una célula huésped utilizada en un método para la preparación de un análogo cíclico de acuerdo con la invención es preferiblemente un procariota Gram positiva, un procariota Gram negativa o una eucariota. Los ejemplos de células huéspedes adecuadas incluyen bacterias del ácido láctico, tales como *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* y la bacteria Gram negativa *E. coli*.

En lugar de un acoplamiento de ciclación enzimática de un deshidroaminoácido con una cisteína, la ciclación también es posible mediante incubación a pH alcalino. Este acoplamiento inducido por el pH se usa ventajosamente para formar (metil)lantioninas, por ejemplo, cuando una prolina precede directamente a una cisteína que excluye la actividad efectiva de la ciclasa. Alternativamente, en el caso de péptidos que no son ciclados por la ciclasa NisC, la ciclación entre dehidroalanina y cisteína puede tener lugar espontáneamente, lo que -dependiendo del péptido- puede o no dar como resultado diferentes isómeros. Por lo tanto, en una realización alternativa de la invención, el cierre del anillo se logra de una manera no enzimática, por ejemplo, mediante la exposición de un análogo precursor deshidratado que comprende un residuo de deshidroalanina o deshidrobutirina y un residuo de cisteína en las posiciones deseadas para un tratamiento químico que induce la formación de un puente tioéter. Por ejemplo, el cierre del anillo químico puede implicar la exposición de un péptido que comprende una dehidroalanina y una cisteína durante al menos 10 minutos a pH 8-8 (Burrage et al Chem Eur J, 2000 Biomimetic synthesis of lantibiotics. 6, 1455- 1466) o de un péptido con una dehidrobutirina y una cisteína durante aproximadamente 10 horas a pH 8-9 (Zhu et al 2003 Biomimetic studies on the stereoselective lantionine formation. Org. Biomol. Chem. 1, 3304-3315).

En otra realización más, el análogo de apelina se sintetiza mediante síntesis química con soporte sólido, tal como de acuerdo con el procedimiento descrito por Knerr et al. (J. Am. Chem. Soc., 2012, 134 (18), pp 7648-7651) o referencias citadas en el mismo.

En vista de su efecto (diferencial) sobre el receptor de APJ combinado con una estabilidad incrementada, un análogo de apelina cíclica como se proporciona aquí encuentra ventajosamente su uso como medicamento. Por lo tanto, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un análogo de apelina de acuerdo con la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El análogo puede administrarse como la entidad, como tal, o como una sal de adición ácida o básica farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con un ácido inorgánico (tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico); o con un ácido orgánico (tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico); o por reacción con una base inorgánica (tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio); o con una base orgánica (tal como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas). Como un compuesto peptídico cíclico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la presente invención, se prefiere un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una forma sustancialmente purificada. Más del 80% o más de las purezas es más preferible.

El receptor de apelina APJ está asociado con trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad cardiovascular isquémica, cardiomiopatía viral, estabilización de vasos linfáticos, trastornos del sistema endocrino y hormonales, retinopatía diabética y enfermedades metabólicas, enfermedades gastrointestinales y hepáticas.

trastornos de cáncer, enfermedades inflamatorias, trastornos hematológicos, enfermedades respiratorias, trastornos músculo-esqueléticos, trastornos neurológicos, trastornos urológicos, enfermedades dermatológicas, cicatrización de heridas y trastornos de reproducción.

- 5 La invención proporciona agonistas y antagonistas que contienen (metil)lantionina del receptor de APJ, cuya aplicación selectiva depende de la enfermedad. Además, se prevé que las apelinas de lantionina afectan a la heterodimerización conocida del receptor APJ con el receptor AT1 con relevancia terapéutica.

10 Para los agonistas del receptor de apelina existen múltiples áreas terapéuticas. Los objetivos primarios para las propiedades de neovascularización de la apelina son los músculos del corazón y las piernas. La estimulación del receptor APJ generalmente tiene relevancia terapéutica cardiovascular. Otros campos de aplicación son, por ejemplo, la fibrosis, para la cual la (metil)lantionina-apelina puede tener propiedades de reversión y neuroprotección. Apelina tiene efectos terapéuticos en neonatales expuestos a hiperoxia. En otras enfermedades, por ejemplo, los casos de los antagonistas del receptor de apelina de neoangiogénesis patológica son valiosos: nefropatía diabética (Zhang 2013 PLOS 8 | Número 4 | e60457 página 1-11); crecimiento antitumoral (Sorli 2006 Drug discovery today 11, 1100-1106); Retinopatía isquémica. Los antagonistas se obtienen, por ejemplo, reemplazando F13 con ala13. El bloqueo del receptor APJ, que es coreceptor para la infección por VIH, contribuye a la prevención de la infección por VIH. El bloqueo del receptor de APJ puede contribuir a reducir la formación patológica de los vasos excedentarios observados en la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE).

20 Por lo tanto, las aplicaciones terapéuticas a manera de ejemplo incluyen todas aquellas conocidas o sugeridas para asociarse con la señalización a través del sistema apelinérgico, por ejemplo, afecciones relacionadas con el balance hídrico alterado, trastornos inducidos por el estrés, tal como ansiedad y depresión, trastornos cardiovasculares y metabólicos. En una realización, el análogo de apelina produce vasodilatación dependiente del endotelio, vasoconstricción independiente del endotelio y/o un aumento de la fuerza de contracción del corazón. La apelina tiene efectos antiinflamatorios en crías de rata tratadas con hiperoxia. La invención proporciona un análogo de apelina cíclico para uso en un método para el tratamiento o prevención de una afección cardiovascular, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en hipoxia, isquemia e hipertensión arterial pulmonar. En una realización adicional, el análogo de apelina encuentra su uso en la modulación de la angiogénesis, por ejemplo en tumores.

30 El APJ es también un coreceptor del tipo I (VIH-1) del virus de la inmunodeficiencia humana, y la apelina bloquea la entrada del VIH-1 a través del APJ. La inhibición de la infección por VIH en células CHO y células NP-2 que expresan CD4 y receptor después de la preincubación con péptidos de apelina apoya el papel de APJ como un coreceptor para VIH y VIH-2. La incubación de células negativas para CD4 pero positiva para APJ con CD4 soluble permitió la infección por VIH. Por consiguiente, en otra realización adicional, una apelina cíclica de la invención se usa para el tratamiento del VIH.

35 Como se usa aquí, "tratamiento" significa aliviar o curar síntomas o enfermedades, y/o sus síntomas acompañantes. "Prevención" significa un método para retrasar o prevenir la aparición de síntomas o enfermedad, y/o los síntomas que lo acompañan, un método para evitar que un paciente adquiera síntomas o enfermedad, o un método para reducir el riesgo de que un paciente adquiera síntomas o enfermedad.

40 La composición farmacéutica de la presente invención se fabrica mezclando adecuadamente un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la presente invención con al menos uno o más tipos de vehículos farmacéuticamente aceptables, etc. en cantidades adecuadas de acuerdo con los métodos conocidos en el campo técnico de la preparación medicinal. Las cantidades de contenido de un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la presente invención en la composición farmacéutica cambian dependiendo de las formas de dosificación, dosificaciones, etc., pero son del 0.1 al 100% del peso de toda la composición farmacéutica, por ejemplo.

50 Una "composición farmacéutica" incluye preparaciones orales tales como tabletas, cápsulas, gránulos, polvos, trochiscus, jarabes, emulsiones y suspensiones, y preparaciones parenterales tales como preparaciones externas, supositorios, inyecciones, soluciones oftálmicas, agentes intranasales y agentes pulmonares.

55 Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen varias sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas convencionales, por ejemplo, sustancias en preparaciones sólidas tal como excipientes, desintegradores, aglutinantes, deslizantes y lubricantes, y sustancias en preparaciones líquidas tal como solventes, agentes solubilizantes, agentes suspensores, agentes isotonzantes, amortiguadores y agentes calmantes. Si es necesario, se utilizan aditivos tal como conservantes, antioxidantes, colorantes y edulcorantes. Los "excipientes" incluyen, por ejemplo, lactosa, azúcar blanda blanca, D-manitol, D-sorbitol, almidón de maíz, dextrina, celulosa microcristalina, celulosa cristalina, carmelosa, calcio carmelosa, sodio carboxi-metil-almidón, hidroxipropilcelulosa poco sustituida y acacia. Los deslizantes incluyen, por ejemplo, ácido silícico anhidro ligero y estearato de magnesio. Los lubricantes incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de calcio y talco. Los solventes incluyen, por ejemplo, agua purificada, etanol, propilen glicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y aceite de oliva. Los agentes solubilizantes incluyen, por ejemplo, propilen glicol, D-manitol, benzoato de bencilo, etanol, trietanolamina, carbonato de sodio y citrato de sodio. Los "agentes de suspensión" incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, carmelosa,

hidroxipropilcelulosa, propilen glicol, povidona, metilcelulosa y monoestearato de glicerilo. Los amortiguadores incluyen, por ejemplo, fosfato de hidrógeno disódico, acetato de sodio, carbonato de sodio y citrato de sodio.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a mamíferos distintos de los humanos (por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, cobayas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas, caballos, ovejas, monos) y para humanos, en administración oral o parenteral (por ejemplo, tópica, de recto, intravenosa) en una cantidad terapéuticamente efectiva. Aunque la "cantidad terapéuticamente efectiva" cambia según los pacientes, la enfermedad, los síntomas, las formas de dosificación, las vías de administración, por ejemplo, la dosificación en el caso de administración oral al paciente adulto (peso: aproximadamente 60 kg) que padece una enfermedad cardiovascular normalmente, varía de aproximadamente 1 mg a 1 g por día utilizando, como ingrediente activo, un análogo de apelina cíclica o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la presente invención. Dicha cantidad puede ser administrada al paciente una vez o varias veces al día.

Se puede usar la composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la presente invención como ingrediente activo o un activador, y también son útiles los kits (conjunto de administración, tratamiento y/o prevención), paquetes (productos de embalaje, etc.) y el kit de medicamentos (y/o el envase) que contiene el inserto de paquete sobre la composición farmacéutica que indica que la composición farmacéutica o debe usarse para el tratamiento y/o la prevención. Dicho conjunto, el paquete y el conjunto de medicamentos pueden estar provistos con uno o más envases llenos con uno o más ingredientes activos y otros medicamentos, o el medicamento (o el componente) para las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente. Como ejemplos de un conjunto, se incluyen un paquete y un conjunto de medicamentos de este tipo, el conjunto para el comercio dirigido apropiadamente al tratamiento y/o prevención de una enfermedad objetiva y el paquete para el comercio. Como un inserto de paquete incluido en dicho conjunto, se incluyen un paquete y conjunto de medicamentos, notas de la organización gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, y notas que muestran la aprobación de la organización gubernamental sobre la fabricación, uso o venta del producto relevante para la medicación a un ser humano. En el kit, paquete y conjunto de medicamentos mencionados anteriormente, también puede incluirse el producto envasado, y puede incluirse la estructura constituida por la adopción de un paso de medicación adecuado (paso), y puede incluirse la estructura constituida sobre cómo podría alcanzar el tratamiento y/o la prevención en un medicamento más preferible, incluyendo el tratamiento, la prevención de una enfermedad objetivo.

Un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la presente invención se puede usar por el método general que se realiza actualmente en el campo medicinal en combinación (en adelante "terapia de combinación") con uno o varios otros fármacos (en adelante, un "fármaco concomitante"). El momento para la administración de un análogo de apelina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la presente invención y un fármaco concomitante no está limitado. Pueden administrarse al paciente como un fármaco combinado, o pueden administrarse al paciente simultáneamente o en un intervalo constante. Se puede usar un conjunto farmacéutico que se caracteriza por consistir en una composición farmacéutica de la presente invención y un fármaco concomitante. La dosificación de un fármaco concomitante debe cumplir con la dosificación en uso clínico, y puede seleccionarse de manera adecuada según los pacientes, la enfermedad, los síntomas, las formas de dosificación, las vías de administración, el tiempo de administración, la combinación. El método de administración de un fármaco concomitante no está limitado en particular, y un compuesto o una de sus sales en la presente invención y un fármaco concomitante deben ponerse juntos.

El fármaco concomitante incluye, por ejemplo,

- (1) un agente terapéutico y/o profiláctico de un trastorno cardiovascular, aterosclerosis, reestenosis o enfermedad cardiovascular isquémica
- (2) un agente terapéutico y/o profiláctico del sistema endocrino y trastornos hormonales, retinopatía diabética o enfermedad metabólica
- (3) un agente terapéutico del cáncer,
- (4) un agente terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad inflamatoria, y
- (5) en la presente invención se puede usar en combinación un agente terapéutico del VIH, y uno o más de estos agentes y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Para fines de claridad y una descripción concisa, las características se describen aquí como parte de las mismas o realizaciones separadas, sin embargo, se apreciará que el alcance de la invención puede incluir realizaciones que tengan combinaciones de todas o algunas de las características descritas. A la vista de este pasaje, es evidente para el lector experto que las variantes de la reivindicación 1 tal como se presentan pueden combinarse con otras características descritas en la solicitud tal como se presenta, en particular con las características divulgadas en las reivindicaciones dependientes, tales reivindicaciones se relacionan usualmente con las realizaciones más preferidas de una invención.

Sección experimental

Ejemplo 1: Síntesis de análogos de apelina estabilizados con lantionina

Las variantes de apelina que contenían lantionina se realizaron de acuerdo con los procedimientos establecidos descritos por ejemplo en Kluskens, L.D., et al. (2005) Post-translational Modification of Therapeutic Peptides por NisB, the Dehydratase of the Lantibiotic Nisin. *Biochemistry* 44, 12827-12834; Kluskens, L.D., et al. (2009) Angiotensin-(1-7) with thioether-bridge: an ACE-resistant, potent Ang-(1-7) analogue. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 328, 849-854; Rink, R. et al. (2007) NisC, the cyclase of the lantibiotic nisin, can catalyze cyclization of designed non-lantibiotic peptides. *Biochemistry* 46, 13179-13189.

En resumen, se utilizó *Lactococcus lactis* que comprende un sistema de dos plásmidos. El primer plásmido codificó el péptido líder de la nisina lantibiótica.

MSTKDFNLDLVS VKKDSGASPR fusionado genéticamente en su terminal C al precursor del (metil)lantionina-apelina objetivo que contiene en la posición i una serina/treonina y en la posición i+3, i+4, i+5 o i+6 una cisteína. Alternativamente, el primer plásmido codificado guía de nisina seguido por los primeros 17 aminoácidos de nisina y un sitio de escisión de endoproteinasa Glu-C (E):

MSTKDFNLDLVS VKKDSGASPRITSISLCTPGCKTGALM IE. La metionina terminal en N suele ser escindida por el huésped.

El plásmido que codifica el péptido de fusión que comprende el líder de nisina y el precursor de la apelina de (metil)lantionina se coexpresó en *L. lactis* con el segundo plásmido del plásmido pL3BTC, que codifica las enzimas de maduración NisB y NisC, y la enzima de translocación NisT. NisB deshidrató la serina o la treonina para producir deshidroalanina y deshidrobutirina, respectivamente. Posteriormente, la ciclasa NisC acopló covalentemente el deshidroaminoácido a la cisteína, produciendo una lantionina o metilantionina, respectivamente. El cultivo de *L. lactis* se hizo crecer durante la noche en medio GM17 suplementado con 4 µg/ml de Eritromicina y 4 µg/ml de Cloroanfenicol a 30°C (Kluskens LD, et al. (2005). Post-translational modification of therapeutic peptides by NisB, the dehydratase of the lantibiotic nisin. *Biochemistry* 44:12827-12834). Luego se pasó 1/100 de volumen a Minimal Medium y el cultivo se hizo crecer durante la noche a 30°C (Rink R, et al. (2005) Lantibiotic structures as guidelines for the design of peptides that can be modified by lantibiotic enzymes. *Biochemistry* 44:8873-8882).

El sobrenadante se recogió mediante centrifugación (10 min, 12857 g) y posteriormente se filtró al vacío (0.2 µm). El péptido se purificó de la fracción media utilizando columnas de cromatografía de intercambio iónico HiTrap SP HP (GE Healthcare, Suecia). La fracción recogida que incluía el péptido se desaló (columna PD10, Amersham) y se secó al vacío.

El péptido (metil)lantionina-apelina se liberó mediante digestión proteolítica con 10 U/ml de Endoproteinasa Glu-C en amortiguador de fosfato de sodio de 50 mM, pH 7.6 a 37°C. La incubación durante 48 horas a dicha temperatura da como resultado la conversión completa de una glutamina (Q) terminal N en piroglutamato (pE). Si se requiere una Q terminal N, el tiempo de digestión con Glu-C se mantiene en un mínimo de unas pocas horas. El péptido de fusión digerido se separó en una columna de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (HPLC) (Jupiter 4 µm Proteo 90A, C12, Phenomenex). La separación se llevó a cabo a 1.0 mL/min en un gradiente de 15 a 40% de acetonitrilo en agua miliQ, en la presencia de ácido trifluoroacético al 0.1%. Las fracciones pico (detectadas a 214 nm) se recogieron y analizaron mediante espectrometría de masas Maldi-TOF (Voyager-DE Pro, Applied Biosystems).

La ausencia o presencia de una (metil)lantionina se evaluó mediante incubación con CDAP, que se agrega a las cisteínas no modificadas pero no a las (metil)lantioninas (Rink 2007 *Biochemistry* 46, 13179-13189).

En algunos casos, la serina deshidratada se acopló a la cisteína de una manera no enzimática, dando como resultado diferentes isómeros. Las lantioninas (Ala-S-Ala) se indican como [Lan-Lan]; metilantioninas (Abu-S-Ala y Ala-S-Abu) como [meLan-meLan].

Ejemplo 2: Unión de variantes de lantionina-apelina al receptor APJ

Métodos: ensayo de unión competitiva APJ

Los experimentos de unión de [Glp⁶⁵, Nle⁷⁵, Tyr⁷⁷] [¹²⁵I]-Apelina 13 se llevan a cabo en un formato de 96 pocillos SPA. Las membranas utilizadas en este ensayo se preparan a partir de células HEK293 que expresan de forma estable ya sea hAPJ recombinante o rAPJ. La incubación se inicia mediante la adición de una mezcla de perlas de WGA PVT SPA (0.5 mg/pocillo) y 0.08 µg de membranas a un amortiguador de ensayo (25 mM de HEPES, 10 mM de MgCl₂, 1mM de CaCl₂, BSA al 0.1%, pH 7.4) que contiene 0.06 nM de [Glp⁶⁵, Nle⁷⁵, Tyr⁷⁷] [¹²⁵I]-Apelina 13 y concentraciones crecientes del compuesto analizado (curvas de respuesta de concentración de 10 puntos). La unión no específica se determina en la presencia de 100 nM de apelina 17. Las muestras se incuban durante ocho horas a temperatura ambiente (22 °C). Luego, se leen placas de 96 pocillos en un Microbeta Trilux.

Resultados:

Tabla 2

Unión de hAPJ	
péptido	IC ₅₀ relativo
QRPRLSHKGMPF (peso, control positivo)	0.25
SGASPR::nisA-(1-17)::IE (control negativo)	>1000.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGMPA (mutación F a A)	>1000.0000
pERPRLmeLanHKGmeLanMPF	>1000.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMVF (mutación P a V)	>1000.0000
pEApeM5	115.34
pEApeM6	185.86
pE es piroglutamato.	

Conclusiones

- Las mutaciones P a A o P a V anulan la unión. Sin embargo, el Ejemplo 8 aquí abajo muestra una actividad significativa de QRPRLAHLanGPMLanF. Por lo tanto, el efecto de ruptura de la hélice de una prolina puede ser imitado por un puente de lantionina. Mutante F a A no se unen.
- Dos apelininas que contienen lantionina han retenido la capacidad de unirse al receptor APJ. Su capacidad de unión es menor que la del apelinina-13 de tipo silvestre. Sin embargo, debe señalarse que las apelininas de lantionina tienen un pE en lugar de una Q, lo que puede explicar en parte la reducción de la unión al receptor.

Ejemplo 3: Las apelininas de lantionina afectan los niveles de AMPc en células que expresan el receptor APJ.

Métodos: ensayo de AMPc estimulado con forskolina

El nivel de AMP cíclico en células HEK293 que expresan receptores APJ recombinantes se analiza mediante un inmunoensayo competitivo de HTRF. Las células a una densidad de 4000 células/pocillo se resuspenden en amortiguador de ensayo (HBSS que contiene Ca²⁺ y Mg²⁺ suplementado con BSA al 0.1% y 5 mM de HEPES) y se agregan a la placa de ensayo. La incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente se inicia con la adición de concentraciones crecientes de los compuestos que contienen 10 µM de forskolina y 0.5 mM de IBMX. La reacción se detiene mediante la adición de un amortiguador de lisis que incluye AMPc marcado con d2, seguido por la adición de un anticuerpo monoclonal anti-AMPc marcado con criptato, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia resuelta en el tiempo a 620 y 665 nm se mide en un instrumento Envision después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. El contenido de AMPc en las muestras se determina por interpolación en una curva estándar de AMPc.

Resultados:

Tabla 3

AMPc	
péptido	EC ₅₀ (nM) relativo
QRPRLSHKGMPF	0.017

SGASPR::nisA-(1-17)::IE (control negativo)	>300.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMPA	>300.0000
pERPRLmeLanHKGmeLanMPF	>300.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMVF	>300.0000
pEApeM5	29.265
pEApeM6	19.585

Conclusión:

- 5 Las dos variantes que unen el receptor como se demuestra en el ejemplo 1, son activas con respecto a la modulación del nivel de AMPc.

Ejemplo 4: las apelininas de lantionina afectan el reclutamiento de arrestina

10 Métodos:

Ensayo de reclutamiento de β -arrestina hAPJ

- 15 La estimulación de la interacción de hAPJ con β -arrestina se estudia utilizando el sistema PathHunter™ de DiscoverX. La línea celular CHO-K1 se diseñó para coexpresar APJ marcado con ProLink/Enzyme donante (PK) y las proteínas de fusión β -arrestina marcadas con el activador de enzimas (EA). Tras la activación de GPCR, se produce la complementación del fragmento de enzima, para producir una enzima β -Gal activa. Estas células se siembran a una densidad de 15000 células/pocillo. Al día siguiente, las células se estimulan con compuestos con perfil agonista potencial en diferentes concentraciones. Después de 90 minutos de incubación a 37°C con los
- 20 compuestos, las células se lisan y se incuban con reactivo PathHunter durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las muestras se leen con un protocolo de luminiscencia ultrasensible utilizando un instrumento Envision (Perkin Elmer).

Resultados:

25

Tabla 4

Reclutamiento de arrestina	
péptido	EC ₅₀ relativo
QRPRLSHKGMPF (peso, control positivo)	0.4895
SGASPR::nisA-(1-17)::IE (control negativo)	>300.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMPA (control negativo)	>300.0000
pERPRLmeLanHKGmeLanMPF	>300.0000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMVF	>300.0000
pEApeM5	14.0877

Conclusiones:

30

La variante pEApeM5 tiene una actividad significativa en este ensayo.

Ejemplo 5: Las apelinas que contienen lantionina no interactúan con el receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁).

En vista de la homología entre el receptor APJ y AT₁, se investigó si las lantioninas-apelinas interactúan con el receptor tipo 1 de angiotensina II. Por ejemplo, sería indeseable para varias aplicaciones terapéuticas si las variantes de lantionina de la apelina estimularan el receptor AT₁.

Métodos:

La acción agonística y antagonista de lantionina apelinas se midió a través de ensayos de beta-arrestina acoplados a AT₁.

Resultados:

Tabla 5

Beta arrestina (AT ₁ R)	
péptido	Acción agonística de EC ₅₀ relativo
QRPRLSHKGPMFP	>1000.0000
pEApeM5	>1000.0000
pEApeM6	>1000.0000

Beta arrestina (AT ₁ R)	
péptido	Acción antagonista de EC ₅₀ relativo
QRPRLSHKGPMFP	>500.0000
pEApeM5	>500.0000
pEApeM6	>500.0000

Conclusión:

Las apelinas de lantionina no actuaron de manera agonística ni manera antagonista sobre el receptor AT₁.

Ejemplo 6: ensayo de internalización del receptor hAPJ

Métodos:

Las células HEK293 se siembran 24 horas antes del experimento al 50% de confluencia en 2 matraces x F75. A la mañana siguiente, las células se tripsinizan, se agitan en vórtex durante 60 segundos y se pasan a través de un filtro de malla de 40 micrones. Las células se resuspenden a una densidad de 300,000 células/ml en OptiMEM + 2% de FBS, y el virus Ad-GFP-hAPJ se agrega a una MOI de 1 PFU/célula. Las células se agitan en vórtex y se dispensan en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos a una concentración de 10,000 células/pocillo. Las células se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la unión de las células a la placa antes de la incubación durante la noche a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. A la mañana siguiente, los análogos de apelina se agregan en una curva de respuesta de concentración (500 nM máx.). La translocación APJ-GFP se observa y documenta en el microscopio confo-focal Olympus FV. Una ejecución de translocación típica se completa en 3 horas con la mayoría de los efectos observados en los primeros 90 minutos de exposición del compuesto.

Resultados:

Tabla 6

Internalización de HAPJ

péptido	EC ₅₀ (nM) relativo
pERPRLSHKGPMMPF	0.22
QRPRLSHKGPMMPF	0.58
pERPRLmeLanHKGmeLanMPF	>1000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMVF	>1000
pERPRLmeLanHKmeLanGPMP	>1000
pEApeM6	207
pERPRLmeLanHKmeLanGMPMA	36
pEApeM7	33
pEApeM5	1.25

Conclusión:

- 5 Como la internalización puede reflejar la desensibilización, se prefieren las variantes que muestran capacidad de señalización pero que tienen una internalización reducida. En esta serie, teniendo en cuenta la señalización de AMPc en el ejemplo 2, se prefiere pEApeM6.

Ejemplo 7: Lantionina apelina ha aumentado la resistencia a la descomposición por las peptidasas en plasma.

10 Métodos:

- Estabilidad de los análogos de la apelina en plasma de rata. La apelina (0.1 mg/ml de concentración final de apelina) se incubó en un 10% de plasma de rata que se amortiguó con amortiguador de fosfato de 16 mM de 7.4 a 37°C. Las muestras se enfriaron mediante acidificación hasta la concentración final de TFA al 5%. Las muestras fueron
15 analizadas en HPLC. Las alturas de los picos se representaron en relación con las alturas de los picos iniciales.

Resultados:

Tabla 7

20

Péptido	Estabilidad de T50 en plasma de rata (h)
QRPRLSHKGPMMPF	1
pERPRLSHKGPMMPF	3
Apelinas cíclicas	
pEApeI3c	2
pEApeI4a	2
pEApeI5dS I	2
pEApeI5cS I	3
pEApeM12S	3
pEApeM6deltaF	3
pEApeM7S I	6
pERPRL[AbuHKA]GMPMA	7

pEApeT8cS	8
pEApeM6	8
pEApeM5	9
pEApeM6deltaF	10
pERPRL[AbuHKA]GPMVF	10
pEApeM7	15
pEApeM8	24
pEApeM5T	24
pEApeM26 I	> 24
pEApeM26 II	> 24
pEApeM27 I	> 24
pEApeM27 II	> 24

Conclusión:

5 Claramente, el péptido con pGlu y lantionina es mucho más estable que el péptido lineal con Q. Tanto el pGlu como la lantionina contribuyen a la estabilidad.

La comparación de la variante pEApeM5T con pEApeM5 demuestra una estabilidad mejorada por el residuo Dhb.

10 Ejemplo 8: Inhibición de la ruta del AMPc y estimulación de la ruta de la B-arrestina mediante la estimulación del receptor APJ.

Se probaron las variantes de (Me)lan apelina con los ensayos de AMPc y beta arrestina de la compañía DiscoverX.

Tabla 8

15

	AMPc EC ₅₀ (nM)	β-arrestina EC ₅₀ (nM)	Proporción β- arrestina/ AMPc
QRPRLSHKGPMPPF	0.2 - 0.5	2.2 - 2.8	7
QRPRLAHKGPMPPF (control)	0.6	12	20
pEApeT4cS I	33	740	22
pEApeI3c	17	2840	167
pEApeI4a	12.8	1110	87
pEApeM5	7.0	67	9
pEApeM6	21	93	4
pEApeM7	27	500	18
pEApeM7S I	1.3	62	47
pEApeM7S II	2.6	255	98
pEApeI5cS I	2.5	149	59
pEApeI5cS II	2.3	34	14
pEApeI5dS I	2.1	616	293
	2.4	155	64
pEApeI5dS II			
pEApeT8cS	2.0	245	122
pEApeM5T	190	32	0.16

pEApeM6deltaF	125	385	3
pEApeM6 amidado	80	60	0.75
pEApeM9S I	18	520	84
pEApeM9S II	0.2	40	200
pEApeM12S	600	>10000	>16
pEApeM8	125	>1000	>8
pEApeM26S I	0.6	5.3	8.8
pEApeM26S II	1.0	4.2	4.2
pEApeM27S I	3	149	50
pEApeM27S II	0.3	10	33

Conclusiones

- 5 - Varias variantes de (metil)lantionina estimulan la ruta del AMPc en concentraciones inferiores o ligeramente superiores a las del control lineal de S a A.
- 10 - La capacidad para estimular la ruta de la beta arrestina es bastante variable y depende del péptido. Esto implica una actividad fuertemente diferencial de varias variantes; esto se ilustra por la variación en los valores de la última columna que da la proporción de ambas rutas.
- En particular, las variantes de lantionina parecen muy activas.
- 15 - No solo la sustitución de un aminoácido por parte de la lantionina, sino también la inserción de (parte de) la lantionina produce variantes activas.
- Dos variantes estimulan más efectivamente la ruta de beta arrestina que la ruta de AMPc.

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de apelina cíclica de la fórmula general X1-X2-X3X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14, que comprende un puente de lantionina de la estructura Ala-S-Ala o un puente de metilLantionina de la estructura Abu-S-Ala o Ala-S-Abu, en la que

X1 está ausente;
 X2 es pGlu;
 X3 es Arg
 X4 es Pro, Pro-(me)Lan,;
 X5 es Arg, (me)Lan, Arg-(me)Lan,;
 X6 es Leu, (me)Lan, Leu-(me)Lan,;
 X7 es Ala, (me)Lan,;
 X8 es His, (me)Lan,;
 X9 es Lys, (me)Lan, Lys-(me)Lan,;
 X10 es Gly, (me)Lan,;
 X11 es Pro, (me)Lan, Pro-Lan;
 X12 es Met, (me)Lan, Met-(me)Lan;
 X13 está ya sea ausente o seleccionado de Pro, Dhb, (me)Lan,;
 X14 es el terminal C y está ya sea ausente o es Phe, a menos que X13 esté ausente;
 en la cual

Abu indica ácido aminobutírico y Dhb indica deshidrobutirina;
 (me) Lan indica Lan o meLan, en la que Lan denota la mitad de terminal N o C de una Lantionina (Ala-S-Ala) y meLan denota la mitad de terminal N o C de una metilLantionina (Abu-S-Ala o Ala-S-Abu);
 con la condición de que:

(i) el análogo contiene hasta dos residuos de Ala;
 (ii) la secuencia X4 a X13 contiene un par de meLan o un par de Lan que juntos forman un puente de (metil)Lantionina; y
 (iii) en la que dicho puente de (metil)Lantionina es del tamaño que comprende dos, tres, cuatro o cinco residuos debajo del anillo;

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

2. Análogo de apellina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X2-X3-X4-X5-X6 es pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu.

3. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que X5, X6, X7 o X9 es (me)Lan

4. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la secuencia X7-X8-X9-X10 es (me)Lan-His-Lys-(me)Lan, preferiblemente Lan-His-Lys-Lan, o en el que la secuencia X7-X8-X9-X10 es (me)Lan-His-Lys-(me)Lan-Gly, preferiblemente Lan-His-Lys-Lan-Gly.

5. Análogo de apellina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia X4-X5-X6-X7-X8 es Pro-(me)Lan-Arg-Leu-Ala-(me)Lan o Pro-Arg-(me)Lan-Arg Leu-Ala-(me)Lan.

6. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia X11-X12-X13-X14 es (me)Lan-Met-Pro-Phe.

7. Análogo de apellina de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

pERPmeLanRLAmeLanKGPMPPF, pERPLanRLALanKGPMPPF,
 pERPRmeLanLameLanKGPMPPF, pERPLanLAHLanGPMPPF,
 pERPRLmeLanHKmeLanPMPF, pERPRLmeLanHKmeLanPMdhbF,
 pERPRLlanAHKlanPMPF, pERPRLlanAHKlanGPMPPF,
 pERPRLmeLanHKmeLanGPMPPF, pERPRLmeLanHKmeLanGPMPPF-NH₂,
 pERPRLmeLanHKmeLanGPMP, pERPRLlanHKlanGPMPPF,
 pERPRLmeLanHKGmeLanPMPF, pERPRLlanHKGLanPMPF,
 pERPRLAHlanGPMLanF, pERPRLlanHKGLanMPF, pERPRLmeLanHKGmeLanMPF,
 pERPRLlanHKGPLanPF, pERPRLlanHKGPLanMPF, pERPRLlanHKGPMLanF y
 pERPRLlanHKGPMLanPF.

8. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, capaz de inducir la producción de AMPc en las células que expresan un receptor de apelina (APJ) con un EC₅₀ de 0.1-200 nM preferiblemente 0.1-5 nM.

9. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que exhibe una reducción de beta-arrestina asociada a la internalización del receptor de apelina en comparación con la apelina-13 nativa.
10. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que muestran una estabilidad (T50) en plasma de rata de al menos 3 horas, preferiblemente al menos 6 horas, más preferiblemente al menos 8 horas.
11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso como medicamento.
12. Análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso en un método para tratar una afección relacionada con un balance hídrico alterado, un trastorno inducido por el estrés como la ansiedad y la depresión, un trastorno cardiovascular o un trastorno metabólico, preferiblemente un trastorno cardiovascular.
13. Un método para proporcionar un análogo de apelina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende:
 - a) proporcionar una célula huésped que comprende:
 - una molécula de ácido nucleico que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder terminal N encontrado dentro del péptido precursor de un lantipéptido/lantibiótico y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un análogo de péptido, por lo que dicho primer y segundo fragmento están dentro del mismo marco abierto de lectura de dicha molécula de ácido nucleico;
 - una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima capaz de deshidratar serina y/o treonina;
 - opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína transportadora;
 - b) permitir la traducción de dicho primer ácido nucleico; y
 - c) recoger dicho análogo peptídico.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende el cierre del anillo por medios químicos o enzimáticos, preferiblemente por medios enzimáticos.
15. Método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en QRPTRLACKGPMMPF, QRPSRLACKGPMMPF, QRPRTLACKGPMMPF, QRPSLAHCGPMMPF, QRPRLTHKCPMPF, QRPRLSAHKCPMPF, QRPRLSAHKCGPMMPF, QRPRLTHKCGPMMPF, QRPRLTHKCGPMMPF-NH₂, QRPRLTHKCGMP, QRPRLSHKCGPMMPF, QRPRLTHKGCMPMPF, QRPRLSHKGCMPMPF, QRPRLAHSGPMCF, QRPRLSHKGCMPF, QRPRLTHKGCMPF, QRPRLSHKGPCPF, QRPRLSHKGPCMPF, QRPRLSHKGPMCF y QRPRLSHKGPMCPF.