Industria y
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-167109- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:32:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

T=F=S

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE

INVENCIÓN

TITULO: MIMÉTICOS DE APELINA SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA

SOLICITANTE: NOVARTIS AG.

DIRECCIÓN: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 31 de julio de 2014

P2014/000106

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-167109- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:32:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000106**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: NOVARTIS AG
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
Nacionalidad o Domicilio: Suiza
Lugar de Constitución: Suiza
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/IB2013/050666 Fecha Enero 25, 2013

Publicación Internacional No. WO 2013/111110 Fecha Agosto 01, 2013

(6) **Título (54)** MIMÉTICOS DE APELINA SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA

Clasificación Internacional (51) C07K 7/56, C07K 14/47, A61K 38/12

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Enero 27, 2012	61/591,557
US	Octubre 24,2012	61/717,760
US	Noviembre 30, 2012	61/731,697

(9) **Comprobante de pago No.** 14- **Fecha** _____

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2013/050666

Andrei GOLOSOV
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Philipp GROSCHE
Postfach CH-4002 Basel
Suiza

Qi-Ying HU
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Hidetomo IMASE
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

David Thomas PARKER
250 Massachusetts Avenue,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Kayo YASOSHIMA
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Frederic ZECRI
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Hongjuan ZHAO
250 Massachusetts Avenue,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0078628

Bogotá D.C., Julio 24 de 2014 - 13:23:04

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	632304175	23/07/2014	13.906.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-167109- -00000-0000
Fecha: 2014-07-31 16:32:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha:	Recorrido:
2020	2021 / 7 / 31 (AAAA MM DD)	4

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14167109	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
El cd anexo contiene un total de Archivos:
(7) Archivos en formato PDF, los cuales fueron procesados en el folio (5) correctamente
Clasificar.

6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-167109- -00000-0000

Fecha: 2014-07-31 16:32:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000106**

SOLICITUD DE:

1

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: NOVARTIS AG
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
Nacionalidad o Domicilio: Suiza
Lugar de Constitución: Suiza
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2013/050666 Fecha Enero 25, 2013

Publicación Internacional No. WO 2013/111110 Fecha Agosto 01, 2013

6

Título (54) **MIMÉTICOS DE APELINA SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA**

Clasificación Internacional (51) C07K 7/56, C07K 14/47, A61K 38/12

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Enero 27, 2012	61/591,557
US	Octubre 24,2012	61/717,760
US	Noviembre 30, 2012	61/731,697

9

Comprobante de pago No. 14- **Fecha** _____

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2013/050666

Andrei GOLOSOV
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Philipp GROSCHE
Postfach CH-4002 Basel
Suiza

Qi-Ying HU
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Hidetomo IMASE
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

David Thomas PARKER
250 Massachusetts Avenue,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Kayo YASOSHIMA
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Frederic ZECRI
100 Technology Square,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

Hongjuan ZHAO
250 Massachusetts Avenue,
Cambridge, MA 02139
Estados Unidos de America

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Miniusticia

4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis"

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciled in

domiciliado en

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Arthur Canonica

Pascal Traub

Date/Fecha: June 27, 2006

City,Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland

Attestation

1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.

3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)

M. Staehelin Notar

Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven), 2009 (two thousand and nine).

Leg.Prot.Nr. 975 /2006

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by .....
   .....
3. in his/her function as .....
4. and certified by the seal of the .....
   .....

Certified 24. May. 2006

5. in Basel (Bâle) 6. on .....
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. no. 2'049'13'389
9. Seal / stamp: 10. Signature:

Heidi Fischer

STATE CHANCERY * BASLE-CITY *

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 August 2013 (01.08.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/111110 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 7/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2013/050666

(22) International Filing Date:
25 January 2013 (25.01.2013)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/591,557 27 January 2012 (27.01.2012) US
61/717,760 24 October 2012 (24.10.2012) US
61/731,697 30 November 2012 (30.11.2012) US

(71) Applicant: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventors: **GOLOSOV, Andrei**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (US). **GROSCHE, Philipp**; Novartis Pharma AG, Postfach, CH-4002 Basel (CH). **HU, Qi-Ying**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (US). **IMASE, Hidetomo**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (US). **PARKER, David, Thomas**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US). **YASOSHIMA, Kayo**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (US). **ZECRI, Frederic**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (US). **ZHAO, Hongjuan**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (US).

(74) Agent: **BINET-CROSS, Sophie**; Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

(54) Title: SYNTHETIC APELIN MIMETICS FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

(57) Abstract: The invention provides a synthetic polypeptide of Formula 1': or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12 and X13 are defined herein. The polypeptides are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the polypeptides of the invention, and its therapeutic uses such as treatment or prevention of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

WO 2013/111110 A2

SYNTHETIC APELIN MIMETICS FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

FIELD OF THE INVENTION:

The invention relates to novel compositions comprising modified peptide and polypeptide sequences designed to treat cardiovascular disease in subjects to whom they are administered, and which exhibit greater resistance to degradation, and equivalent or greater bioactivity than their wild type counterparts. The invention also relates to methods of making said compositions and using said compositions as pharmaceutically active agents to treat cardiovascular disease.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

The incidence of heart failure in the Western world is approximately 1/100 adults after 65 yrs of age. The most common pathology is a chronic deficit in cardiac contractility and, thereby, cardiac output, i.e., the effective volume of blood expelled by either ventricle of the heart over time. Patients with chronic heart failure can have acute episodes of decompensation, i.e., failure of the heart to maintain adequate blood circulation, where cardiac contractility declines further. There are ~500K hospitalizations per year for "acute decompensated heart failure" (ADHF) in the USA alone.

Current therapies for ADHF include diuretics, vasodilators, and inotropes, which directly increase cardiac contractility. Current intravenous inotropes (dobutamine, dopamine, milrinone, levosimendan) are used in the acute setting, despite their association with adverse events such as arrhythmia and increased long-term mortality. These liabilities have prevented their application in chronic heart failure. Digoxin is an oral inotrope, but is limited by a narrow therapeutic index, increased arrhythmogenic potential and contraindication in renal insufficiency.

A therapy for heart failure that increases cardiac contractility without arrhythmogenic or mortality liabilities is urgently needed for ADHF, but could also address the enormous unmet medical need in chronic heart failure.

Apelin is the endogenous ligand for the previously orphan G-protein-coupled receptor (GPCR), APJ, also referred to as apelin receptor, angiotension-like-1 receptor, angiotension II-like-1 receptor, and the like. The apelin/APJ pathway is widely expressed in the cardiovascular system and apelin has shown major beneficial cardiovascular effects in preclinical models. Acute apelin administration in humans causes peripheral and coronary

vasodilatation and increases cardiac output (Circulation. 2010; 121:1818-1827). As a result, APJ agonism is emerging as an important therapeutic target for patients with heart failure. Activation of the apelin receptor APJ is thought to increase cardiac contractility and provide cardioprotection, without the liabilities of current therapies. However, the native apelins exhibit a very short half life and duration of action *in vivo*.

It is therefore desirable to identify peptides and polypeptides that mimic the function of apelin, but have increased half-life and demonstrate equivalent or greater bioactivity than the naturally occuring apelin. Furthermore, it is desirable to identify apelin analog peptides and polypeptides which exhibit increased conformational constraints, i.e., the ability to achieve and maintain an active conformational state such that the peptides and polypeptides can interact with their receptors and/or other pathway targets without the need for additional folded or repositioning. There is a need for use of such peptide and polypeptide analogs, compositions comprising said analogs, and methods of making and using said compositions as pharmaceutically active agents to treat diseases, such as cardiovascular diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The aim of the present invention is to provide novel peptides and polypeptides which are useful as APJ agonists, and which also possess at least one of the following improvements over wild type apelin and other known apelin analogs: increased half-life; greater immunity to degradation upon administration and/or upon solubilization; and increased conformational constraints, all while exhibiting the same or greater biological activity as wild type apelin. The peptides and polypeptides of this invention are thus particularly useful for the treatment or prevention of cardiovascular diseases such as heart failure, disorders and conditions associated with heart failure, and disorders and conditions responsive to the activation of APJ receptor activity.

In one embodiment, the peptides and polypeptides of the invention are particularly useful for the treatment or prevention of a disorder or condition associated with heart failure, or a disorder responsive to the activation (or agonism) of the APJ receptor activity. In another embodiment, the peptides and polypeptides of the invention are useful in the treatment of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic

brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

The invention pertains to the peptides and polypeptides, pharmaceutical compositions, and methods of manufacture and use thereof, as described herein. Examples of peptides and polypeptides of the invention include the peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, as well as any peptides or polypeptides specifically listed herein, including but not limited to the experimental examples.

The invention therefore provides a peptide or a polypeptide formula (I'):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Isn, Q, A, K, and 5-amino-valeric acid;
X2 is R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E or Orn;
X3 is P, A, a, p, 4-PhP, K, D, pipecolic acid, or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, A, r, N-Me-R, F, E or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF or F;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond forming either a monosulfide (-S-), a disulfide (-S-S-) or an amide bond (-NHC(O)- or -C(O)-NH-) or a linkage of Formula $–S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-$; wherein Z is O, N-O-$CH_2C(O)-L^1-R^1$ or N-NH-$CH_2C(O)-L^1-R^1$ wherein R^1 is a fatty acid derivative and L^1 is a linker containing one or more amino acids and/or one or more $–NH-C_{2-6}$-alkylene-NH- units;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E or cysteine wherein the side chain of the cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E or 4-amino-Isn;

X9 is G, N-Me-G, A, D, L, R or Aib;
X10 is P, A, p, 4-PhP or pipecolic acid,
X11 is M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F, Y, L, K, 3-PyA or Cha; and
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-β-3-F, I, A, a, K, Dap, H and E;
wherein:
Nle is L-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
hF is L-homophenylalanine;
hK is L-lysine;
Nal is L-naphathaline;
Orn is ornithine;
Aib is α-aminoisobutyric acid;
Dab is (S)-diaminobutyric acid;
Dap is (S)-2,3-diaminopropionic acid;
M(O) is methionine sulfone;
Cha is (S)-β-cyclohexylalanine;
4-amino-Isn is 4-aminopiperidine-4-carboxylic acid;
Isn is isonipecotinoyl;
pE is L-pyroglutamic acid;
3-PyA is 3-(3-pyridyl)-L-alanine;
4-PhF is 4-Phenyl-L-phenylalanine;
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; and
wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

As further explained herein, the art-recognized three letter or one letter abbreviations are used to represent amino acid residues that constitute the peptides and polypeptides of the invention. Except when preceded with “D,” the amino acid is an L-amino acid. When the

one letter abbreviation is a capital letter, it refers to the L-amino acid. When the one letter abbreviation is a lower case letter, it refers to the D-amino acid.

Any of the above-listed amino acid residues of Formula I', or its related formulae described herein, e.g., Formulae I, II to IX, may be substituted in a conservative fashion, provided the peptide or polypeptide of the invention still retains functional activity and structural properties (e.g., half-life extension, protection from degradation, conformational constraint). Principle and examples of permissible conservative amino acid substitutions are further explained herein.

The polypeptides of the invention, by activating APJ receptor, have utility in the treatment of

acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

In a preferred embodiment the polypeptides of the invention are useful in the treatment of acute decompensated heart failure (ADHF).

In another embodiment, the invention pertains to a method for treating disorder or disease responsive to the activation of the APJ receptor, in a subject in need of such treatment, comprising: administering to the subject an effective amount of a polypeptide according to anyone of Formulae I to IX, or an amide, an ester of a salt thereof, such that the disorder or disease responsive to the activation of the APJ receptor in the subject is treated.

In yet another embodiment, the invention pertains to pharmaceutical compositions, comprising a polypeptide according to anyone of Formulae I to IX, or an amide, an ester or salt thereof, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

In still another embodiment, the invention pertains to combinations including, a polypeptide according to anyone of Formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, and pharmaceutical combinations of one or more therapeutically active agents.

In another embodiment, the invention pertains to a method for activation of the APJ receptor in a subject in need thereof, comprising: administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide according to anyone of Formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

For purposes of interpreting this specification, the following definitions will apply unless specified otherwise and whenever appropriate, terms used in the singular will also include the plural and vice versa.

As used herein, "disorders or diseases responsive to the modulation of the APJ receptor," "disorders and conditions responsive to the modulation of the APJ," "disorders and conditions responsive to the modulation of APJ receptor activity," "disorders responsive to the activation (or agonism) of the APJ receptor activity," and like terms include acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

As used herein, "Activation of APJ receptor activity," or "Activation of the APJ receptor," refers to an increase in the APJ receptor activity. The activation of the APJ receptor activity is also refered to as "agonism" of the APJ receptor, e.g., by administration of the peptides and polypeptides of the invention.

As used herein, the terms "polypeptide" and "peptide" are used interchangeably to refer to two or more amino acids linked together. Except for the abbreviations for the uncommon or unatural amino acids set forth in Table 1 below, the art-recognized three letter or one letter abbreviations are used to represent amino acid residues that constitute the peptides and polypeptides of the invention. Except when preceded with "D", the amino acid is an L-amino acid. When the one letter abbreviation is a capital letter, it refers to the D-amino acid. When the one letter abbreviation is a lower case letter, it refers to the L-amino acid. Groups or strings or amino acid abbreviations are used to represent peptides. Peptides are indicated with the N-terminus on the left and the sequence is written from the N-terminus to the C-terminus.

Peptides of the invention contain non-natural amino acids (i.e., compounds that do not occur in nature) and other amino acid analogs as are known in the art may alternatively be employed.

Certain non-natural amino acids can be introduced by the technology described in 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 or in US Patent No. 7,083,970. Briefly, some of these expression systems involve site-directed mutagenesis to introduce a nonsense codon, such as an amber TAG, into the open reading frame encoding a polypeptide of the invention. Such expression vectors are then introduced into a host that can utilize a tRNA specific for the introduced nonsense codon and charged with the non-natural amino acid of choice. Particular non-natural amino acids that are beneficial for purpose of conjugating moieties to the polypeptides of the invention include those with acetylene and azido side chains.

One or more of the natural or un-natural amino acids in a peptide of the invention may be modified, for example, by the addition of a chemical entity such as a carbohydrate group, a phosphate group, a farnesyl group, an isofarnesyl group, a fatty acid group ($C_qH_{q+1}C(O)_2H$ wherein q is 3 to 20), a linker for conjugation, functionalization, or other modification, etc. Said modifications may be done in a site-specific or non-site-specific manner. In a preferred embodiment, the modifications of the peptide lead to a more stable peptide (e.g., one exhibiting greater half-life in vivo). These modifications may include the incorporation of additional D-amino acids, etc. None of the modifications should substantially interfere with the desired biological activity of the peptide, but such modifications may confer desirable properties, e.g., enhanced biological activity, on the peptide.

Said modifications enhance the biological properties of the proteins of the invention relative to the wild-type proteins, as well as, in some cases, serving as points of attachment for, e.g., labels and protein half-life extension agents, and for purposes of affixing said variants to the surface of a solid support.

In certain embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications, are used to attach conjugates, e.g., PEG groups to polypeptides, and/or peptides of the invention, for purposes of, e.g., extending half-life or otherwise improving the biological properties of said polypeptides, and/or peptides. Said techniques are described further herein.

In other embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications, are used to attach other polymers and small molecules and recombinant protein sequences that extend half-life of the polypeptide of the invention. One such embodiment includes the attachment of fatty acids or specific albumin binding compounds to polypeptides, and/or peptides. In other embodiments, the modifications are made at a particular amino acid type and may be attached at one or more sites on the polypeptides.

In other embodiments, such modifications, e.g., site-specific modifications, are used as means of attachment for the production of wild-type and/or variant multimers, e.g., dimers

(homodimers or heterodimers) or trimers or tetramers. These multimeric protein molecules may additionally have groups such as PEG, sugars, and/or PEG-cholesterol conjugates attached or be fused either amino-terminally or carboxy-terminally to other proteins such as Fc, Human Serum Albumin (HSA), etc.

In other embodiments, such site-specific modifications are used to produce proteins, polypeptides and/or peptides wherein the position of the site-specifically incorporated pyrrolysine or pyrrolysine analogue or non-naturally occurring amino acids (para-acetyl-Phe, para-azido-Phe) allows for controlled orientation and attachment of such proteins, polypeptides and/or peptides onto a surface of a solid support or to have groups such as PEG, sugars and/or PEG-cholesterol conjugates attached.

In other embodiments, such site-specific modifications are used to site-specifically cross-link proteins, polypeptides and/or peptides thereby forming hetero-oligomers including, but not limited to, heterodimers and heterotrimers. In other embodiments, such site-specific modifications are used to site-specifically cross-link proteins, polypeptides and/or peptides thereby forming protein-protein conjugates, protein-polypeptide conjugates, protein-peptide conjugates, polypeptide-polypeptide conjugates, polypeptide-peptide conjugates or peptide-peptide conjugates. In other embodiments, a site specific modification may include a branching point to allow more than one type of molecule to be attached at a single site of a protein, polypeptide or peptide.

In other embodiments, the modifications listed herein can be done in a non-site-specific manner and result in protein-protein conjugates, protein-polypeptide conjugates, protein-peptide conjugates, polypeptide-polypeptide conjugates, polypeptide-peptide conjugates or peptide-peptide conjugates of the invention.

In some embodiments, the present invention provides complexes which comprise at least one peptide or polypeptide of anyone of Formulae I-IX bound to an antibody, such as an antibody why specifically binds a peptide or polypeptide as disclosed herein.

One of ordinary skill in the art will appreciate that various amino acid substitutions, e.g, conservative amino acid substitutions, may be made in the sequence of any of the polypeptides described herein, without necessarily decreasing its activity. As used herein, “amino acid commonly used as a substitute thereof” includes conservative substitutions (i.e., substitutions with amino acids of comparable chemical characteristics). For the purposes of conservative substitution, the non-polar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, glycine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar (hydrophilic), neutral amino acids include serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine,

and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Examples of amino acid substitutions include substituting an L-amino acid for its corresponding D-amino acid, substituting cysteine for homocysteine or other non natural amino acids having a thiol-containing side chain, substituting a lysine for homolysine, diaminobutyric acid, diaminopropionic acid, ornithine or other non natural amino acids having an amino containing side chain, or substituting an alanine for norvaline or the like.

The term “amino acid,” as used herein, refers to naturally occurring amino acids, unnatural amino acids, amino acid analogues and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids, all in their D and L stereoisomers if their structure allows such stereoisomeric forms. Amino acids are referred to herein by either their name, their commonly known three letter symbols or by the one-letter symbols recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

The term “naturally occurring” refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, “non-naturally occurring,” “un-natural,” and the like, as used herein, refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man. When used in connection with amino acids, the term “naturally occurring” refers to the 20 conventional amino acids (i.e., alanine (A or Ala), cysteine (C or Cys), aspartic acid (D or Asp), glutamic acid (E or Glu), phenylalanine (F or Phe), glycine (G or Gly), histidine (H or His), isoleucine (I or Ile), lysine (K or Lys), leucine (L or Leu), methionine (M or Met), asparagine (N or Asn), proline (P or Pro), glutamine (Q or Gln), arginine (R or Arg), serine (S or Ser), threonine (T or Thr), valine (V or Val), tryptophan (W or Trp), and tyrosine (Y or Tyr)).

The terms “non-natural amino acid” and “unnatural amino acid,” as used herein, are interchangeably intended to represent amino acid structures that cannot be generated biosynthetically in any organism using unmodified or modified genes from any organism, whether the same or different. The terms refer to an amino acid residue that is not present in the naturally occurring (wild-type) apelin protein sequence or the sequences of the present invention. These include, but are not limited to, modified amino acids and/or amino acid analogues that are not one of the 20 naturally occurring amino acids, selenocysteine, pyrrolysine (Pyl), or pyrroline-carboxy-lysine (Pcl, e.g., as described in PCT patent publication WO2010/48582). Such non-natural amino acid residues can be introduced by substitution of naturally occurring amino acids, and/or by insertion of non-natural amino acids into the naturally occurring (wild-type) Apelin protein sequence or the sequences of the

invention. The non-natural amino acid residue also can be incorporated such that a desired functionality is imparted to the apelin molecule, for example, the ability to link a functional moiety (e.g., PEG). When used in connection with amino acids, the symbol "U" shall mean "non-natural amino acid" and "unnatural amino acid," as used herein.

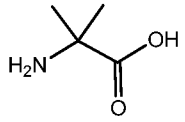
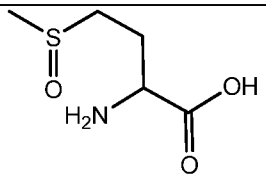
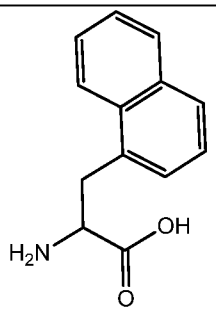
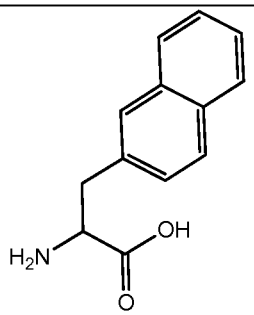
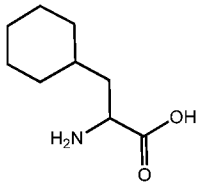
In addition, it is understood that such "unnatural amino acids" require a modified tRNA and a modified tRNA synthetase (RS) for incorporation into a protein. These "selected" orthogonal tRNA/RS pairs are generated by a selection process as developed by Schultz et al. or by random or targeted mutation. As way of example, pyrroline-carboxy-lysine is a "natural amino acid" as it is generated biosynthetically by genes transferred from one organism into the host cells and as it is incorporated into proteins by using natural tRNA and tRNA synthetase genes, while p-aminophenylalanine (See, 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) is an "unnatural amino acid" because, although generated biosynthetically, it is incorporated into proteins by a "selected" orthogonal tRNA/tRNA synthetase pair.

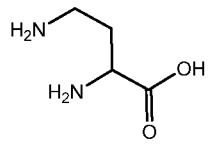
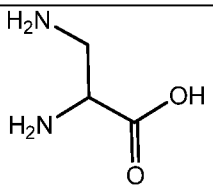
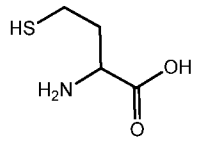
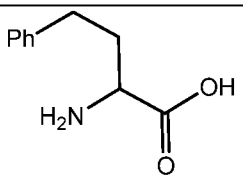
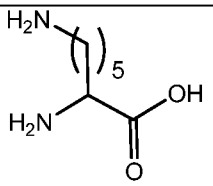
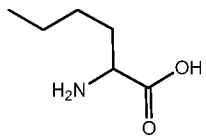
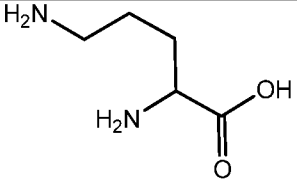
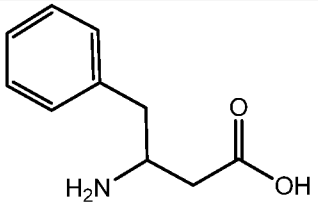
Modified encoded amino acids include, but are not limited to, hydroxyproline, γ-carboxyglutamate, O-phosphoserine, azetidinecarboxylic acid, 2-aminoadipic acid, 3-aminoadipic acid, beta-alanine, aminopropionic acid, 2-aminobutyric acid, 4-aminobutyric acid, 6-aminocaproic acid, 2-aminoheptanoic acid, 2-aminoisobutyric acid, 3-aminoisobutyric acid, 2-aminopimelic acid, tertiary-butylglycine, 2,4-diaminoisobutyric acid, desmosine, 2,2'-diaminopimelic acid, 2,3-diaminoproprionic acid, N-ethylglycine, N-methylglycine, N-ethylasparagine, homoproline, hydroxylysine, allo-hydroxylysine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, isodesmosine, allo-isoleucine, N-methylalanine, N-methylglycine, N-methylisoleucine, N-methylpentylglycine, N-methylvaline, naphthalanine, norvaline, norleucine, ornithine, pentylglycine, pipecolic acid and thioproline. The term "amino acid" also includes naturally occurring amino acids that are metabolites in certain organisms but are not encoded by the genetic code for incorporation into proteins. Such amino acids include, but are not limited to, ornithine, D-ornithine, and D-arginine.

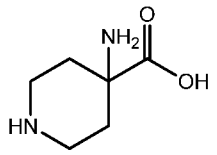
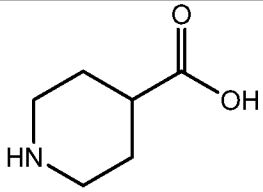
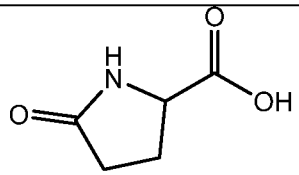
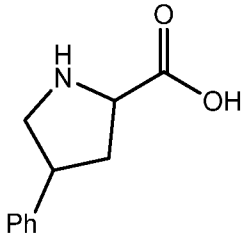
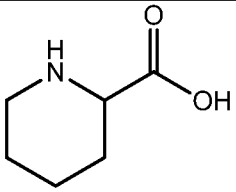
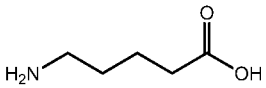
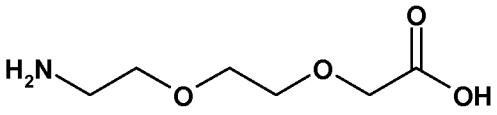
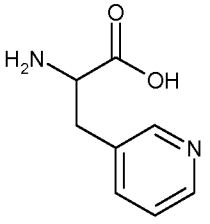
The term "amino acid analogue," as used herein, refers to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, by way of example only, an α-carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group. Amino acid analogues include the natural and unnatural amino acids which are chemically blocked, reversibly or irreversibly, or their C-terminal carboxy group, their N-terminal amino group and/or their side-chain functional groups are chemically modified. Such analogues

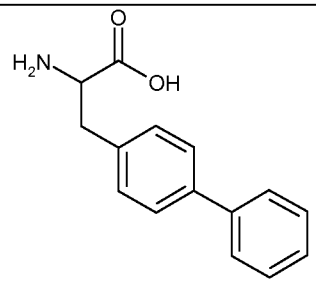
include, but are not limited to, methionine sulfoxide, methionine sulfone, S-(carboxymethyl)-cysteine, S-(carboxymethyl)-cysteine sulfoxide, S-(carboxymethyl)-cysteine sulfone, aspartic acid-(beta-methyl ester), N-ethylglycine, alanine carboxamide, homoserine, norleucine, and methionine methyl sulfonium.

Table 1: Un-natural or Non-natural Amino Acids as described in the invention:

Symbol	Name	Structure
Aib	α-Aminoisobutyric acid	
M(O)	Methionine sulfone	
1-Nal	1-Naphthalanine	
2-Nal	2-Naphthalanine	
Cha	β-Cyclohexylalanine	

Dab	Diaminobutyric acid	
Dap	2,3-Diamino propionic acid	
hC	Homocysteine	
hF	Homophenylalanine	
hK	Homolysine	
Nle	Norleucine	
Orn	Ornithine	
β-3-F	β-3-phenylalanine	

4-amino-Isn	4-Aminopiperidine-4-carboxylic acid (4 amino group form the peptidic bond)	
Isn	Isonipecotinoic acid	
pE	Pyroglutamic acid	
4-PhP	4-Phenylproline	
	Pipecolinic acid	
	5-Aminovaleric acid	
O2Oc	8-Amino-3,6-dioxaoctanoic acid	
3-PyA	3-(3-pyridyl)-alanine	

4-PhF	4-phenyl-phenylalanine	

Nal refers both *to* 1-Naphthalanine and 2-Naphthalanine, preferably 2-naphthalanine.
4-Phenylproline refers to both cis and trans 4-Phenylproline, preferably trans-4-phenylproline

As used herein the term “amide” refers to an amide derivative of the carboxylic acid group at the C-terminus (e.g. -C(O)NH_2, -C(O)NH-C_{1-6} alkyl,- C(O)NH-C1-2alkylphenyl , -C(O)NH-NHBn or -C(O)N(C_{1-6} alkyl)$_2$).

The term “amide” also refer to derivative of the amino group at the N-terminus (e.g. -NHC(O)C_{1-16}alkyl, -NHC(O)$(CH_2)_n$Ph (n is an integer of 1 to 6), -NHC(O)$(CH_2)_2CO_2H$, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$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- or $CH_3(OCH_2CH_2)_m$C(O)NH- (m is an interger of 1 to 12).

As used herein, the term “ester” refers to an ester derivative of the carboxylic acid group at the C-terminus (e.g -COOR) form wherein R of the ester refers to C_{1-6} alkyl groups such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, etc., C_{3-8} cycloalkyl groups such as cyclopentyl, cyclohexyl, etc., C_{6-10} aryl groups such as phenyl, α-naphthyl, etc., C_{6-10} aryl-C_{1-6} alkyl groups, for example phenyl-C_{1-2} alkyl groups such as benzyl, phenethyl, benzhydryl, etc., and α -naphthyl-C_{1-2} alkyl groups such as α -naphthylmethyl and the like. Mention may also be made of pivaloyloxymethyl ester and the like, which are commonly used as esters for oral administration. When the polypeptides of the invention possess additional carboxyl or carboxylate groups in positions other than the C terminus, those polypeptides in which such groups are amidated or esterified also fall under the category of the polypeptide of the invention. In such cases, the esters may for example be the same kinds of esters as the C-terminal esters mentioned above.

The term “APJ” (also referred to as “apelin receptor,” “angiotension-like-1 receptor,” “angiotension II-like-1 receptor,” and the like) indicates a 380 residue, 7 transmembrane domain, *Gi* coupled receptor whose gene is localized on the long arm of chromosome 11 in humans (NCBI Reference Sequence: NP_005152.1, and encoded by NCBI Reference

Sequence: NM_005161). APJ was first cloned in 1993 from genomic human DNA using degenerate oligonucleotide primers (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993) and shares significant homology with angiotensin II receptor type 1. Despite this homology however, angiotensin II does not bind APJ. Although orphan for many years, the endogenous ligand has been isolated and named apelin (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

The term "apelin," indicates a 77 residue preprotein (NCBI Reference Sequence: NP_0059109.3, and encoded by NCBI Reference Sequence: NM_017413.3), which gets processed into biologically active forms of apelin peptides, such as apelin-36, apelin-17, apelin-16, apelin-13, apelin-12. The full length mature peptide, referred to as "apelin-36," comprises 36 amino acids, but the most potent isoform is the pyroglutamated form of a 13mer of apelin (apelin-13), referred to as "Pyr-1-apelin-13 or Pyr^{1}-apelin-13" Different apelin forms are described, for instance, in United States Patent 6,492,324B1.

Polypeptides of the invention:

Various embodiments of the invention are described herein. It will be recognized that features specified in each embodiment may be combined with other specified features to provide further embodiments.

In embodiment 1, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide formula (I'):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

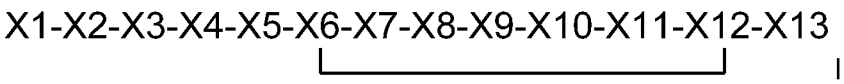
wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Isn, Q, A, K, and 5-amino-valeric acid;
X2 is R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E or Orn;
X3 is P, A, a, p, 4-PhP, K, D, pipecolic acid, or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, A, r, N-Me-R, F, E or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF or F;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond forming either a disulfide or an amide bond;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E or cysteine wherein the side chain of the cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E or 4-amino-Isn;
X9 is G, N-Me-G, A, D, L, R or Aib;
X10 is P, A, p, 4-PhP or pipecolic acid,
X11 is M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F, Y, L, K, 3-PyA or Cha; and
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-β-3-F, I, A, a, K, Dap, H and E;
wherein:
Nle is L-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
hF is L-homophenylalanine;
hK is L-lysine;
Nal is L-naphathaline;
Orn is ornithine;
Aib is α-aminoisobutyric acid;
Dab is (S)-diaminobutyric acid;
Dap is (S)-2,3-diaminopropionic acid;
M(O) is methionine sulfone;
Cha is (S)-β-cyclohexylalanine;
4-amino-Isn is 4-aminopiperidine-4-carboxylic acid;
Isn is isonipecotinoyl;
pE is L-pyroglutamic acid;
3-PyA is 3-(3-pyridyl)-L-alanine;
4-PhF is 4-Phenyl-L-phenylalanine;
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; and

wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 2, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide formula (I):



wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Q, A, K, 5-amino-valeric acid and Isn;
X2 is R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK or Orn;
X3 is P, A, a, p, 4-PhP, pipecolic acid, or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, A, r, N-Me-R or cysteine wherein the side chain of cysteine form a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, Cha, A, D-L, N-Me-L or F;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N or cysteine wherein the side chain of the cysteine form a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, k, F, f, A, hF, N-Me-R or 4-amino-Isn;
X9 is G, N-Me-G, A or Aib;
X10 is P, A, p, 4-PhP or pipecolic acid,
X11 is M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F, Y, L, K or Cha; and
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-β-3-F, I, A, a, K, Dap
wherein:

Nle is L-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
hF is L-homophenylalanine;
hK is L-lysine;
Nal is L-naphathaline;
Orn is ornithine;
Aib is α-aminoisobutyric acid;
Dab is (S)-diaminobutyric acid;
Dap is (S)-2,3-diaminopropionic acid;
M(O) is methionine sulfone;
Cha is (S)-β-cyclohexylalanine;
4-amino-Isn is 4-Aminopiperidine-4-carboxylic acid;
Isn is isonipecotinoyl;
pE is L-pyroglutamic acid;
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; and
wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In one aspect of embodiment 1 or 2, the invention pertains to peptide or polypeptide of Formula I or I' wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a fatty acid via an amide bond. In a further aspect of this embodiment, the fatty acid is selected from Lauroyl, Myristoyl or Palmitoyl, wherein Lauroyl is $C_{11}H_{23}C(O)$-, Myristoyl is $C_{13}H_{27}C(O)$- and Palmitoyl is $C_{15}H_{31}C(O)$-. Alternatively the terminal CH_3 moiety of the fatty acid (such as Lauroyl, Myristoyl or Palmitoyl) may be oxidized to its corresponding carboxylic acid.

In one aspect of embodiment 1 or 2, the invention pertains to peptide or polypeptide of Formula I or I' wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond, wherein the lipophilic group is selected from a fatty acid as decribed supra and Lauroyl(O2Oc), Myristoyl(O2Oc)

and palmitoyl(O2Oc) and wherein Lauroyl(O2Oc) is $C_{11}H_{23}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2C(O)-$; Myristoyl(O2Oc) is $C_{13}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2C(O)-$; palmitoyl(O2Oc) is $C_{15}H_{31}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2C(O)-$. Alternatively the terminal CH_3 moiety of the fatty acid (such as Lauroyl, Myristoyl or Palmitoyl) may be oxidized to its corresponding carboxylic acid.

In embodiment 3, the invention pertains to a peptide or polypeptide of Formula I or I':

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Q, A, K(palmitoyl), K(Myristoyl), K(Lauroyl), 5-amino-valeric acid and Isn;
X2 is R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK or Orn;
X3 is P, A, a, p, 4-PhP, pipecolic acid, or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, A, r, N-Me-R or cysteine wherein the side chain of cysteine form a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, Cha, A, D-L, N-Me-L or F;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K(Lauroyl), K(Palmitoyl), Nal, F, P, Dap, N or cysteine wherein the side chain of the cysteine form a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, k, F, f, A, hF, N-Me-R or 4-amino-Isn;
X9 is G, N-Me-G, A or Aib;
X10 is P, A, p, 4-PhP or pipecolic acid,
X11 is M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F, Y, L, K(Palmitoyl) or Cha; and
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-β-3-F, I, A, a, K(Lauroyl), K(Myristoyl), K(palmitoyl), K(O2Oc-Palmitoyl), Dap(Palmitoyl);
wherein:

K(Lauroyl) is N-ε-lauroyl-L-lysine;

K(palmitoyl) is N-ε-palmitoyl-L-lysine;

K(Myristoyl) is N-ε-myristoyl-L-lysine;

K(O2Oc-Palmitoyl) is N-ε-(O2Oc-Palmitoyl)-L-lysine; and Palmitoyl(O2Oc) is $C_{15}H_{31}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-$;

Nle is L-norleucine;

D-hC is D-homocysteine

hC is L-homocysteine;

hF is L-homophenylalanine;

hK is L-lysine;

Nal is L-naphathaline;

Orn is ornithine;

Aib is α-aminoisobutyric acid;

Dab is (S)-diaminobutyric acid;

Dap is (S)-2,3-diaminopropionic acid;

M(O) is methionine sulfone;

Cha is (S)-β-cyclohexylalanine;

4-amino-Isn is 4-Aminopiperidine-4-carboxylic acid;

Isn is isonipecotinoyl;

pE is L-pyroglutamic acid;

and wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 4, the invention pertains to a peptide or a polypeptide according to embodiment 1, 2 or 3, having Formula II:

X1-R-P-R-X5-X6-X7-X8-X9-P-X11-X12-X13

II

X1 is absent, pE, R, Q or Isn;

X5 is L or Cha;

X7 is H, Aib, F, K(Lauroyl) or K(palmitoyl);

X8 is K, F or 4-amino-Isn;

X9 is G or Aib;

X11 is Nle or Cha;
X13 is absent or is F, f, K(Lauroyl), K(palmitoyl);
X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond; or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6; and
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 5, the invention pertains to a peptide or a polypeptide according to embodiment 4 wherein:
X1 is absent, pE, R, Q or Isn;
X5 is L or Cha;
X7 is H, Aib, F, K(Lauroyl) or K(palmitoyl);
X8 is K, F or 4-amino-Isn;
X9 is G or Aib;
X11 is Nle or Cha;
X13 is absent or is F, f, K(Lauroyl), K(palmitoyl);
X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond; or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6; and
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 6, a further aspect of embodiment 4, the invention pertains to a peptide or polypetide of Formula II wherein:
X1 is absent, pE, R, Q or Isn;
X5 is L or Cha;
X7 is H, Aib, F, K(Lauroyl) or K(palmitoyl);
X8 is K, F or 4-amino-Isn;

X9 is G or Aib;
X11 is Nle or Cha;
X13 is absent or is F, f, K(Lauroyl), K(palmitoyl);
X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond; and wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In yet a further aspect of anyone of the previous embodiments, more specifically of anyone of embodiments 1 to 6, the invention pertains to peptide and polypeptide of Formula I, I' or II wherein X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 7, the invention pertains to a peptide or polypeptide of Formula I, I' or II, according to anyone of the previous embodiments, more specifically of anyone of embodiments 1 to 6, wherein X6 and X12 are independently selected from K, Orn, Dab, E and D and wherein the side chain of X6 and X12 form together an amide bond; or an amide, an ester or a salt of the peptide or polypeptide. In a further aspect of this embodiment, X6 is K, Orn or Dab and X12 is E or D and the side chain of X6 and X12 form an amide bond. In yet another aspect of this embodiment, X6 is K and X12 is E or D.

In embodiment 8, the invention pertains to a peptide or polypeptide of Formula I, I' or II, according to anyone of the previous embodiments, more specifically of anyone of embodiments 1 to 6, wherein X6 and X12 are independently C, c, D-hC or hC wherein the side chain of X6 and X12 form together a disulfide bond; or an amide, an ester or a salt of the peptide or polypeptide. In a further aspect of this embodiment, X6 and X12 are C.

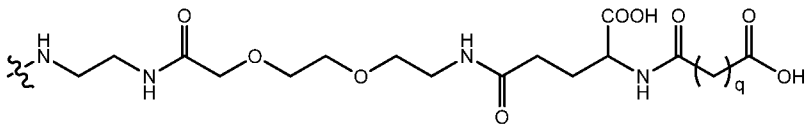
In embodiment 8A, the invention pertains to a peptide or polypeptide of Formula I, I' or II, according to anyone of the previous embodiments, more specifically of anyone of embodiments 1 to 6, wherein X6 and X12 are independently C, c, D-hC or hC wherein the

side chain of X6 and X12 form together a monosulfide (-S-) bond; or an amide, an ester or a salt of the peptide or polypeptide. In a further aspect of this embodiment, X6 and X12 are C.

In embodiment 8B, the invention pertains to a peptide or polypeptide of Formula I, I' or II, according to anyone of the previous embodiments, more specifically of anyone of embodiments 1 to 6, wherein X6 and X12 are independently C, c, D-hC or hC wherein the side chain of X6 and X12 form together a linkage moiety of Formula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; wherein =Z is =O , =N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 or =N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1 wherein R^1 is a fatty acid derivative and L^1 is a linker containing one or more amino acids and/or one or more –NH-C_{2-6}-alkylene-NH- units; or an amide, an ester or a salt of the peptide or polypeptide. In a further aspect of this embodiment, X6 and X12 are C.

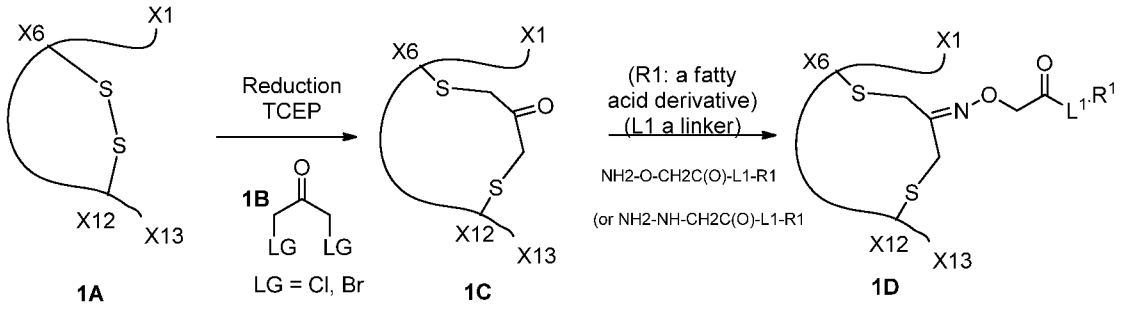
L1 is a suitable organic linker that connects a fatty acid derivative to the polypeptide via an ester or an amide bond. Typically the linker contains one or more amino acid moieties such as for example (O2Oc) unit or Glutamic acid, or contains –NH-C_{2-6}alkylene-NH- diamino units or combination thereof. R^1 is a property-modifying group such as fatty acid derivative which can be added to increase the half-life of the polypeptide. In one aspect of this embodiment, R1 is a fatty acid of Formula $C_qH_{q+1}C(O)_2H$ wherein q is 3 to 20. Optionally the terminal CH_3 unit may be oxidized to its corresponding carboxylic acid.

In one particular embodiment, -L^1-R^1 is of Formula:



q is an integer of 3 to 20. Preferably, q is an integer of 12 to 18.

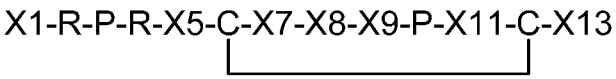
A peptide or polypeptide of Formula I, I' or II wherein X6 and X12 are independently C, c, D-hC or hC wherein the side chain of X6 and X12 form together a linkage moiety of Formula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; wherein =Z is =O , =N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 or =N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1 can be synthesized according to Scheme 1:



Scheme 1

Reduction of the polypeptide disulfide bond in (1A) is followed by a nucleophilic reaction di-electrophilic compound (1B) forming polypeptide (1C). The ketone functionality of the polypeptide (1C) condensed readily with an oxiamine or hydrazine to generate polypeptide 1D.

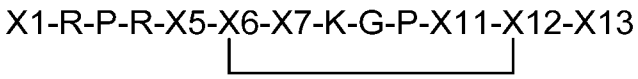
In embodiment 9, certain polypeptides of the invention include peptides or polypeptides according to anyone of embodiment 1 to 6 and 8, having Formula III:



III;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide. In embodiment 9A, the invention pertains to peptides and polypeptides of Formula III wherein the 2 cysteine at position 6 and 12 form a disulfide bond (-S-S-), a monosulfide bond (-S-) or a linkage of Formula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S- wherein Z is as defined *supra*. In a further aspect of embodiment 9 or 9A, the invention includes peptides or polypeptides of Formula III wherein the 2 cysteines in position 6 and 12 form a disulfide bond (-S-S-).

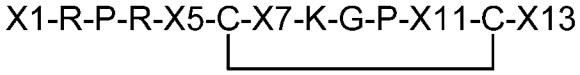
In embodiment 10, certain peptides and polypeptides of the invention include peptides and polypeptides according to anyone of embodiment 1-9 having Formula IV:



IV;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

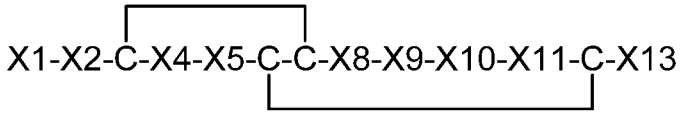
In embodiment 11, certain polypeptides of the invention include polypeptides according to anyone of embodiment 1-6, and 8-10, having Formula V:



V;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide. In embodiment 11A, the invention pertains to peptides and polypeptides of Formula V wherein the 2 cysteine at position 6 and 12 form a disulfide bond (-S-S-), a monosulfide bond (-S-) or a linkage of Formula $–S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-$ wherein Z is as defined *supra*. In a further aspect of embodiment 11 or 11A, the invention includes peptides or polypeptides of Formula V wherein the 2 cysteines in position 6 and 12 form a disulfide bond (-S-S-).

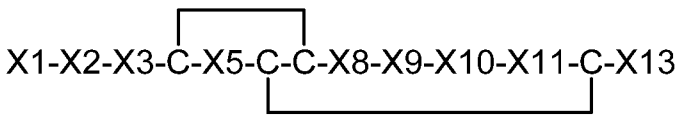
In embodiment 12, the invention pertains to bicyclic peptides or polypeptides of Formula I or I' (according to embodiment 1, 2 or 3) wherein X3 is cysteine and wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position. This embodiment is represented by peptides and polypeptides of Formula VI:



VI

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 13, the invention pertains to bicyclic peptides or polypeptides of Formula I or I' (according to embodiment 1, 2 or 3) wherein X4 is cysteine and wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position. This embodiment is represented by peptides and polypeptides of Formula VII:

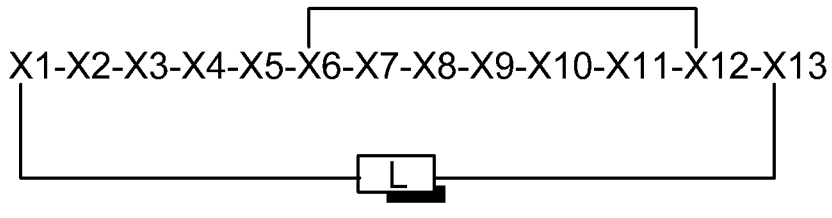


VII

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 14, the invention pertains to a peptide or polypeptide of anyone of Formulae I to V, according to anyone of embodiment 1 to 11; wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; or an amide,

an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto. This embodiment is represented by peptide or polypeptide having Formula VIII:

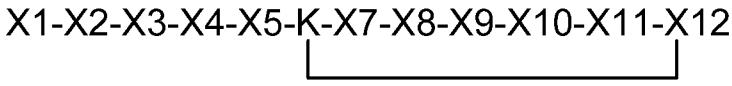


VIII

wherein L is (G)r, G is glycine and r is 1, 2, 3 or 4; or a salt of the polypeptide.

In embodiment 15, a further aspect of embodiment 14, the invention pertains to peptide or polypeptide of Formula VIII wherein X1 is Q, X13 is F and r is 2 or an ester, an amide or a salt thereof.

In embodiment 16, the invention pertains to a peptide or polypeptide according to Formula I or I', according to embodiment 1, 2 or 3, wherein X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 forms an amide bond with the amino side chain of X6. This embodiment is represented by a peptide or polypeptide of Formula IX:



IX,

or an ester, an amide or a salt of the polypeptide.

Any of the or below above-listed amino acid residues of Formula I', or its related formulae and all embodiments described herein, e.g., Formulae I, II to IX, may be substituted in a conservative fashion, provided the peptide or polypeptide of the invention still retains functional activity and structural properties (e.g., half-life extension, protection from degradation, conformational constraint). Principle and examples of permissible conservative amino acid substitutions are further explained herein.

The following embodiments can be used independently, collectively or in any combination or sub-combination:

In embodiment 17, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I', I to VII and IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of the embodiments 1 to 13 and 16) or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X1 is pE.

In embodiment 18, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to VII and IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of the embodiments 1 to 13 and 16) or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X1 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide. In one aspect of this embodiment, the N-terminus of the peptide is an amide. In embodiment 19, a further aspect of embodiment 18, the invention pertains to peptides and polypeptide according to any one of Formulae I to VII and IX, or any of any other classes and subclasses described supra, or an amide, an ester or a salt thereof, wherein the X1 is absent and the N-terminus is an amide of Formula –NHR and R is $CH_3C(O)$-, CH_3-(O-$CH_2CH_2)_m$-C(O)-, Palmitoyl(O2Oc)$_p$, Myristoyl(O2Oc)$_p$, Lauroyl(O2Oc)$_p$ or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-, Acetyl, benzoyl, phenacyl, succinyl, octanoyl, 4-phenylbutanoyl, 4-Cl-Ph-$(CH2)_3C(O)$-,or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-.; and wherein
p is an interger 1 to 4;
m is an integer 1 to 12;
Lauroyl(O2Oc)$_p$ is $C_{11}H_{23}C(O)[NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)]_p$-;
Myristoyl(O2Oc)$_p$ is $C_{13}H_{27}C(O)[NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)]_p$-;
Palmitoyl(O2Oc)$_p$ is $C_{15}H_{31}C(O)[NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)]_p$-. In one particular aspect of this embodiment R is Acetyl, benzoyl, phenacyl, succinyl, octanoyl, 4-phenylbutanoyl, 4-Cl-Ph-(CH2)3C(O)-,or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-.

In embodiment 20, the invention pertains to peptide or polypeptide according to anyone of Formulae I to VII and IX, or any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1-13 and 16), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein N-terminus is an amide of Formula NHR1 wherein R1 is $CH_3C(O)$-, CH_3-(O-$CH_2CH_2)_m$-C(O)-, Palmitoyl(O2Oc), Myristoyl(O2Oc), Lauroyl(O2Oc) or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; and wherein m, Lauroyl(O2Oc), Myristoyl(O2Oc) and Palmitoyl(O2Oc) are defined supra.

In embodiment 21, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to VII, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 13), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X13 is F; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 22, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to VII, or any of any other classes and subclasses described supra,

(i.e. according to anyone of embodiments 1 to 13), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X13 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide. In embodiment 23, one aspect of embodiment 22, The C-terminus is an amide. In embodiment 24, a further aspect of embodiment 23, the invention pertains to peptides and polypeptide according to any one of Formulae I to VII, or any of any other classes and subclasses described supra, or an amide, an ester or a salt thereof, wherein the C-terminus is an amide of Formula –C(O)R2 and R2 is $-NH_2$, -NH-Me, -NH-NHBn, or $-NH-(CH_2)_2$-Ph. In a prefered aspect of embodiment 23, the invention pertains to peptides and polypeptide according to any one of Formulae I to VII, or any of any other classes and subclasses described supra, or an amide, an ester or a salt thereof, wherein the C-terminus is an amide of Formula –C(O)R2 and R2 is $-NH-(CH_2)_2$-Ph.

In embodiment 25, the invention pertains to peptides and polypeptides according to anyone of Formulae I to IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 25), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X5 is L.

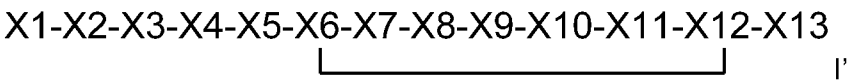
In embodiment 26, the invention pertains to peptides and polypeptides according to anyone of Formulae I to V, VIII and IX, or any of any other classes and subclasses described supra (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 11 and 14-25), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X7 is H.

In embodiment 27, the invention pertains to peptides and polypeptides according to anyone of Formulae I to III and VI to IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 9 and 12 to 26), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X8 is K or F. In a further aspect of this embodiment, X8 is K.

In embodiment 28, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to III and VI to IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 9 and 12 to 27) or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X9 is G.

In embodiment 29, the invention pertains to peptides and polypeptides according to any one of Formulae I to IX, or any of any other classes and subclasses described supra, (i.e. according to anyone of embodiments 1 to 28), or an amide, an ester or a salt thereof, wherein X11 is Nle.

In embodiment 30, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide formula (I'):



I'

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Isn and Q;
X2 is R, r, F or E;
X3 is P, p, K, D or 4-PhF; or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, F, E or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, K, D or 4-PhF;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond forming either a disulfide or an amide bond;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, Aib, K, E, F or cysteine wherein the side chain of the cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, E, F or 4-amino-Isn;
X9 is G, D, L, R or Aib;
X10 is P or pipecolic acid,
X11 is Nle or 3-PyA; and
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, K, H and E;
wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; and

wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 31, the invention pertains to a peptide or polypeptide of embodiment 1, 2 or 3, wherein three of the amino acids X1 to X13 are different from the corresponding amino acids present in Pyr-1-apelin-13. In embodiment 32, the invention pertains to a peptide or polypeptide of embodiment 1, 2 or 3 wherein four of the amino acids X1 to X13 are different from the corresponding amino acids present in Pyr-1-apelin-13.

In another embodiment, X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8. X9, X10, X11, X12 and X13 amino acids are those defined by X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8. X9, X10, X11, X12 and X13 amino acids in the Examples section below.

In another embodiment, individual polypeptides according to the invention are those listed in the Examples section below or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Unless specified otherwise, the term “polypeptide of the present invention” refers to a polypeptide of Formula (I’) and subformulae thereof (Formulae I, II to IX); or an amide, an ester or a salt thereof.

Unless specified otherwise, the terms “polypeptides of the present invention,” “peptides of the present invention,” “apelin peptide agonists,” and the like refer to peptides and polypeptides of Formula I’ and subformulae thereof (Formulae I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII or IX); or an amide, an ester or a salt thereof. The peptides and polypeptides of the invention demonstrate substantially equivalent or improved activity and/or plasma stability over known apelin peptides and polypeptides described herein, including but not limited to wild type apelin, apelin-13 and pyr-1-apelin-13.

The peptides and polypeptides of the invention also encompass peptides and polypeptides that are at least about 95% identical to the peptides and polypeptides according to any one of Formulae I’, I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, as well as to any peptides or polypeptides specifically listed herein, including but not limited to the experimental examples.

As used herein, the phrase “homologous amino acid sequence,” or variations thereof, refers to sequences characterized by a homology, at the amino acid level, of at least a specified percentage and is used interchangeably with “sequence identity.” Homologous amino acid sequences include those amino acid sequences which contain conservative amino acid substitutions and which polypeptides have the same binding and/or activity. In some embodiments, an amino acid sequence is homologous if it has at least 60% or greater, up to 99%, identity with a comparator sequence. In some embodiments, an amino acid sequence is homologous if it shares one or more, up to 60, amino acid substitutions, additions, or deletions with a comparator sequence. In some embodiments, the homologous amino acid sequences have no more than 5 or no more than 3 conservative amino acid substitutions.

Homology may also be at the polypeptide level. The degree or percentage identity of peptides or polypeptides of the invention, or portions thereof, and different amino acid sequences is calculated as the number of exact matches in an alignment of the two sequences divided by the length of the “invention sequence” or the “foreign sequence”, whichever is shortest. The result is expressed as percent identity.

A polypeptide comprising an amino acid sequence having a homology of about 80-99.9%, preferably 90-99.9% to the amino acid sequence described in the specific examples, and possessing a plasma stability superior to apelin-13 or pyr-1-apelin-13, fall under the category of the polypeptide of the invention. In one embodiment, the plasma stability improvement is at least 2 fold. In one embodiment, the polypeptide of the invention has a plasma stability of at least 30 minutes. In another embodiment, the polypeptide of the invention has a plasma stability of at least 60 minutes, preferably at least 100 min and more preferably at least 150 minutes.

The term "substantially equivalent" means the nature of the receptor-binding activity, signal transduction activity and the like is equivalent. Thus, it is allowable that even differences among grades such as the strength of receptor binding activity and the molecular weight of the polypeptide are present.

A polypeptide as described herein, or a substantial equivalent thereto, by substitution, deletion, addition or insertion of one or more of amino acids may be mentioned as polypeptides containing an amino acid sequence substantial equivalent(s) in the above sense. A polypeptide as described herein, or a substantial equivalent thereto, by substitution of 1 to 5, preferably 1 to 3 and more preferably 1 or 2 amino acids with natural or un-natural

amino acids may be mentioned as polypeptides containing an amino acid sequence substantial equivalent(s) in the above sense. Further modifications and alterations may include the replacement of an L-amino-acid with a D-amino acid, or other variation including, but not limited to, phosphorylation, carboxylation, alkylation and the like as long as the apelin agonistic activity of the peptide ot polypeptide of Formulae I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII or IX is maintained and the plasma stability is improved over the pyroglutamated form of apelin-13. For example, D-amino acid are well tolerated with respect to activity and stability of the polypeptide at position 2 (X2), position 3 (X3), positions 5, 6, 7 and 8 (X5, X6, X7 and X8), position 10 (X10) and position 13 (X13) of the cyclic peptides and polypeptides of Formulae I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII or IX.

As used herein, the term “pharmaceutically acceptable salts” refers to salts that retain the biological effectiveness and properties of the polypeptides of this invention and, which typically are not biologically or otherwise undesirable. In many cases, the polypeptides of the present invention are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts can be formed with inorganic acids and organic acids, e.g., acetate, aspartate, benzoate, besylate, bromide/hydrobromide, bicarbonate/carbonate, bisulfate/sulfate, camphorsulfornate, chloride/hydrochloride, chlortheophyllonate, citrate, ethandisulfonate, fumarate, gluceptate, gluconate, glucuronate, hippurate, , hydroiodide/iodide, isethionate, lactate, lactobionate, laurylsulfate, malate, maleate, malonate, mandelate, mesylate, methylsulphate, naphthoate, napsylate, nicotinate, nitrate, octadecanoate, oleate, oxalate, palmitate, pamoate, phosphate/hydrogen phosphate/dihydrogen phosphate, polygalacturonate, propionate, stearate, succinate, sulfosalicylate, tartrate, tosylate and trifluoroacetate salts.

Inorganic acids from which salts can be derived include, for example, hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like.
Organic acids from which salts can be derived include, for example, acetic acid, propionic acid, glycolic acid, oxalic acid, maleic acid, malonic acid, succinic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, toluenesulfonic acid, sulfosalicylic acid, and the like. Pharmaceutically acceptable base addition salts can be formed with inorganic and organic bases.

Inorganic bases from which salts can be derived include, for example, ammonium salts and metals from columns I to XII of the periodic table. In certain embodiments, the salts are derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, magnesium, iron, silver, zinc, and

copper; particularly suitable salts include ammonium, potassium, sodium, calcium and magnesium salts.

Organic bases from which salts can be derived include, for example, primary, secondary, and tertiary amines, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines, basic ion exchange resins, and the like. Certain organic amines include isopropylamine, benzathine, cholinate, diethanolamine, diethylamine, lysine, meglumine, piperazine and tromethamine.

The pharmaceutically acceptable salts of the present invention can be synthesized from a parent compound, a basic or acidic moiety, by conventional chemical methods. Generally, such salts can be prepared by reacting free acid forms of these compounds with a stoichiometric amount of the appropriate base (such as Na, Ca, Mg, or K hydroxide, carbonate, bicarbonate or the like), or by reacting free base forms of these compounds with a stoichiometric amount of the appropriate acid. Such reactions are typically carried out in water or in an organic solvent, or in a mixture of the two. Generally, use of non-aqueous media like ether, ethyl acetate, ethanol, isopropanol, or acetonitrile is desirable, where practicable. Lists of additional suitable salts can be found, e.g., in “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); and in “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, surfactants, antioxidants, preservatives (*e.g.*, antibacterial agents, antifungal agents), isotonic agents, absorption delaying agents, salts, preservatives, drugs, drug stabilizers, binders, excipients, disintegration agents, lubricants, sweetening agents, flavoring agents, dyes, and the like and combinations thereof, as would be known to those skilled in the art (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Except insofar as any conventional carrier is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic or pharmaceutical compositions is contemplated.

The term "a therapeutically effective amount" of a polypeptide of the present invention refers to an amount of the polypeptide of the present invention that will elicit the biological or medical response of a subject, for example, amelioration of a symptom, alleviation of a condition, slow or delay disease progression, or prevention of a disease, etc. In one non-limiting embodiment, the term “a therapeutically effective amount” refers to the amount of the polypeptide of the present invention that, when administered to a subject, is effective to (1) at

least partially alleviate, inhibit, prevent and/or ameliorate a condition, a disorder or a disease or a symptom thereof (i) ameliorated by the activation of the APJ receptor or (ii) associated with the activity of the APJ receptor, or (iii) characterized by abnormal activity of the APJ receptor; or (2) activate the APJ receptor.

In another non-limiting embodiment, the term “a therapeutically effective amount” refers to the amount of the polypeptide of the present invention that, when administered to a cell, or a tissue, or a non-cellular biological material, or a medium, is effective to at least partially activate the APJ receptor. As will be appreicated by those of ordinary skill in the art, the absolute amount of a particular agent that is effective may vary depending on such factors as the desired biological endpoint, the agent to be delivered, the target tissue, etc. Those of ordinary skill in the art understand that “a therapeutically effective amount” may be administered in a single dose or may be achieved by administration of multiple doses. For example, in the case of an agent to treat heartfailure, an effective amount may be an amount sufficient to result in clinical improvement of the patient, e.g., increased exercise tolerance/capacity, increased blood pressure, decrease fliud retention, and/or improved results on a quantitative test of cardiac functioning, e.g., ejection fraction, exercise capacity (time to exhaustion), etc.

As used herein, the term “subject” refers to an animal. Typically the animal is a mammal. A subject also refers to for example, primates (*e.g.*, humans), cows, sheep, goats, horses, dogs, cats, rabbits, rats, mice, fish, birds and the like. In certain embodiments, the subject is a primate. In yet other embodiments, the subject is a human.

As used herein, the term “inhibit”, "inhibition" or “inhibiting” refers to the reduction or suppression of a given condition, symptom, or disorder, or disease, or a significant decrease in the baseline activity of a biological activity or process.

As used herein, the term “treat”, “treating" or "treatment" of any disease or disorder refers in one embodiment, to ameliorating the disease or disorder (i.e., slowing or arresting or reducing the development of the disease or at least one of the clinical symptoms thereof). In another embodiment “treat”, "treating" or "treatment" refers to alleviating or ameliorating at least one physical parameter including those which may not be discernible by the patient. In yet another embodiment, “treat”, "treating" or "treatment" refers to modulating the disease or disorder, either physically, (*e.g.*, stabilization of a discernible symptom), physiologically, (*e.g.*, stabilization of a physical parameter), or both. In yet another embodiment, “treat”, "treating" or "treatment" refers to preventing or delaying the onset or development or progression of the disease or disorder.

As used herein, the terms "prevent", "preventing" and "prevention" refer to the prevention of the recurrence, onset, or development of one or more symptoms of a disorder in a subject resulting from the administration of a therapy *(e.g.,* a therapeutic agent), or the administration ofa combination of therapies *(e.g.,* a combination of therapeutic agents).

As used herein, a subject is “in need of” a treatment if such subject would benefit biologically, medically or in quality of life from such treatment.

As used herein, the term "a,” "an,” "the” and similar terms used in the context of the present invention (especially in the context of the claims) are to be construed to cover both the singular and plural unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by the context.

All methods described herein can be performed in any suitable order unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context. The use of any and all examples, or exemplary language (*e.g.* "such as”) provided herein is intended merely to better illuminate the invention and does not pose a limitation on the scope of the invention otherwise claimed.

The peptides and polypeptides of the present invention can be produced by the per se known procedures for peptide synthesis. The methods for peptide synthesis may be any of a solid-phase synthesis and a liquid-phase synthesis. Thus, the peptide and polypeptide of interest can be produced by condensing a partial peptide or amino acid capable of constituting the protein with the residual part thereof and, when the product has a protective group, the protective group is detached whereupon a desired peptide can be manufactured. The known methods for condensation and deprotection include the procedures described in the following literature (1) - (5).

(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,

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

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

After the reaction, the peptide can be purified and isolated by a combination of conventional purification techniques such as solvent extraction, column chromatography, liquid chromatography, and recrystallization. Where the peptide isolated as above is a free compound, it can be converted to a suitable salt by the known method. Conversely where the isolated product is a salt, it can be converted to the free peptide by the known method.

The amide of polypeptide can be obtained by using a resin for peptide synthesis which is suited for amidation. The resin includes chloromethyl resin, hydroxymethyl resin, benzhydrylamine resin, aminomethyl resin, 4-benzyloxybenzyl alcohol resin, 4-methylbenzhydrylamine resin, PAM resin, 4-hydroxymethylmethylphenylacetamidomethyl resin, polyacrylamide resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-hydroxymethyl)phenoxy resin, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxy resin, 2-chlorotrityl chloride resin, and so on. Using such a resin, amino acids whose α-amino groups and functional groups of side-chain have been suitably protected are condensed on the resin according to the sequence of the objective peptide by various condensation techniques which are known per se. At the end of the series of reactions, the peptide or the protected peptide is removed from the resin and the protective groups are removed and if necessary, disulfide bonds are formed to obtain the objective polypeptide.

For the condensation of the above-mentioned protected amino acids, a variety of activating reagents for peptide synthesis can be used such as HATU, HCTU or e.g. a carbodiimide . The carbodiimide includes DCC, N,N' -diisopropylcarbodiimide, and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. For activation with such a reagent, a racemization inhibitor additive, e.g. HOBt or Oxyma Pure can be used. The protected amino acid can be directly added to the resin along with the activation reagents and racemization inhibitor or be pre-activated as symmetric acid anhydride, HOBt ester, or HOOBt ester then added to the resin. The solvent for the activation of protected amino acids or condensation with the resin can be properly selected from among those solvents which are known to be useful for peptide condensation reactions. For example, N,N-dimethylformamide, N-methylpyrrolidone, chloroform, trifluoroethanol, dimethyl sulfoxide, DMF, pyridine, dioxane, methylene chloride, tetrahydrofuran, acetonitrile, ethyl acetate, or suitable mixtures of them can be mentioned.

The reaction temperature can be selected from the range hitherto-known to be useful for peptide bond formation and is usually selected from the range of about -20°C - 50°C. The activated amino acid derivative is generally used in a proportion of 1.5-4 fold excess. If the condensation is found to be insufficient by a test utilizing the ninhydrin reaction, the

condensation reaction can be repeated to achieve a sufficient condensation without removing the protective group. If repeated condensation still fails to provide a sufficient degree of condensation, the unreacted amino group can be acetylated with acetic anhydride or acetylimidazole.

The protecting group of amino group for the starting material amino acid includes Z, Boc, tertiary-amyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z , adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthalyl, formyl, 2-nitrophenylsulfenyl, diphenylphosphinothioyl, or Fmoc. The carboxy-protecting group that can be used includes but is not limited to the above-mentioned C_{1-6} alkyl, C_{3-8} cycloalkyl and C_{6-10}aryl-C_{1-2}alkyl as well as 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-methoxybenzyl, 4-chlorobenzyl, phenacyl, benzyloxycarbonylhydrazido, tertiary-butoxycarbonylhydrazido, and tritylhydrazido.

The hydroxy group of serine and threonine can be protected by esterification or etherification. The group suited for said esterification includes carbon-derived groups such as lower alkanoyl groups, e.g. acetyl etc. , aroyl groups, e.g. benzoyl etc. , benzyloxycarbonyl, and ethoxycarbonyl. The group suited for said etherification includes benzyl, tetrahydropyranyl, and tertiary-butyl. The protective group for the phenolic hydroxyl group of tyrosine includes Bzl, Cl_2-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, and tertiary-butyl.

The protecting group of imidazole for histidine includes Tos, 4-methoxy-2,3,6-tri ethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, and Fmoc.

The activated carboxyl group of the starting amino acid includes the corresponding acid anhydride, azide and active esters, e.g. esters with alcohols such as pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, HOBt, etc. The activated amino group of the starting amino acid includes the corresponding phosphoramide.

The method for elimination of protective groups includes catalytic reduction using hydrogen gas in the presence of a catalyst such as palladium black or palladium-on-carbon, acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid, or a mixture of such acids, base treatment with diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, piperazine, reduction with sodium metal in liquid ammonia. The elimination reaction by the above-mentioned acid treatment is generally carried out at a temperature of -20°C - 40°C and can be conducted advantageously with addition of a cation acceptor such as anisole, phenol, thioanisole, m-cresol, p-cresol, dimethyl sulfide, 1,4-butanedithiol, 1,2-ethanedithiol. The 2,4-dinitrophenyl group used for protecting the imidazole group of histidine can be eliminated by treatment with

thiophenol, while the formyl group used for protecting the indole group of tryptophan can be eliminated by alkali treatment with dilute sodium hydroxide solution or dilute aqueous ammonia as well as the above-mentioned acid treatment in the presence of 1,2-ethanedithiol, 1,4-butanedithiol.

The method for protecting functional groups which should not take part in the reaction of the starting material, the protective groups that can be used, the method of removing the protective groups, and the method of activating the functional groups that are to take part in the reaction can all be selected judicially from among the known groups and methods.

An another method for obtaining the amide form of the polypeptide comprises amidating the -carboxyl group of the C-terminal amino acid at first, then extending the peptide chain to the N-side until the desired chain length, and then selectively deprotecting the α-amino group of the C-terminal peptide and the α-carboxy group of the amino acid or peptide that is to form the remainder of the objective polypeptide and condensing the two fragments whose α-amino group and side-chain functional groups have been protected with suitable protective groups mentioned above in a mixed solvent such as that mentioned hereinbefore. The parameters of this condensation reaction can be the same as described hereinbefore. From the protected peptide obtained by condensation, all the protective groups are removed by the above-described method to thereby provide the desired crude peptide. This crude peptide can be purified by known purification procedures and the main fraction be lyophilized to provide the objective amidated polypeptide. To obtain an ester of the polypeptide, the a-carboxyl group of the C-terminal amino acid is condensed with a desired alcohol to give an amino acid ester and then, the procedure described above for production of the amide is followed.

The polypeptides of the instant invention, or an amide, an ester of a salt thereof, may be administered in any of a variety of ways, including subcutaneously, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, inhalationally, etc. Particularly preferred embodiments of the invention employ continuous intravenous administration of the polypeptides of the instant invention, or an amide, ester, or salt thereof. The polypeptides on the instant invention may be administered as a bolus or as a continuous infusion over a period of time. An implantable pump may be used. In certain embodiments of the invention, intermittent or continuous polypeptides administration is continued for one to several days (e.g., 2-3 or more days), or for longer periods of time, e.g., weeks, months, or years. In some embodiments, intermittent or continuous polypeptide administration is provided for at least about 3 days. In other embodiments, intermittent or continuous polypeptide administration is provided for at least

about one week. In other embodiments, intermittent or continuous polypeptide administration is provided for at least about two weeks. It may be desirable to maintain an average plasma polypeptide concentration above a particular threshold value either during administration or between administration of multiple doses. A desirable concentration may be determined, for example, based on the subject's physiological condition, disease severity, etc. Such desirable value(s) can be identified by performing standard clinical trials.

In another aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of the present invention or and amide, an ester or a salt thereof and one or more pharmaceutically acceptable carriers. The pharmaceutical composition can be formulated for particular routes of administration such as oral administration, parenteral administration, and rectal administration, etc. In addition, the pharmaceutical compositions of the present invention can be made up in a solid form (including without limitation capsules, tablets, pills, granules, lyophilizates, powders or suppositories), or in a liquid form (including without limitation solutions, suspensions or emulsions). The pharmaceutical compositions can be subjected to conventional pharmaceutical operations such as aseptic manufacturing, sterilization and/or can contain conventional inert diluents, cake forming agents, tonicity agents, lubricating agents, or buffering agents, as well as adjuvants, such as preservatives, stabilizers, wetting agents, emulsifers and buffers, etc.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use typically include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion.

For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition should be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. Preferred pharmaceutical formulations are stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. In general, the relevant carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be

preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, amino acids, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Certain injectable compositions are aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions. Said compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances. Said compositions are prepared according to conventional mixing, granulating or coating methods, respectively, and contain about 0.1-75%, or contain about 1-50%, of the active ingredient.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filration sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze- drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules, e.g., gelatin capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring. Formulations for oral delivery may advantageously incorporate agents to improve stability within the gastrointestinal tract and/or to enhance absorption.

For administration by inhalation, the inventive therapeutic agents are preferably delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer. It is noted that the lungs provide a large surface area for systemic delivery of therapeutic agents.

The agents may be encapsulated, e.g., in polymeric microparticles such as those described in U.S. publication 20040096403, or in association with any of a wide variety of other drug delivery vehicles that are known in the art. In other embodiments of the invention the agents are delivered in association with a charged lipid as described, for example, in U.S. publication 20040062718. It is noted that the latter system has been used for administration of a therapeutic polypeptide, insulin, demonstrating the utility of this system for administration of peptide agents.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means.

Suitable compositions for transdermal application include an effective amount of a polypeptide of the invention with a suitable carrier. Carriers suitable for transdermal delivery include absorbable pharmacologically acceptable solvents to assist passage through the skin of the host. For example, transdermal devices are in the form of a bandage comprising a backing member, a reservoir containing the compound optionally with carriers, optionally a rate controlling barrier to deliver the compound of the skin of the host at a controlled and predetermined rate over a prolonged period of time, and means to secure the device to the skin.

Suitable compositions for topical application, *e.g.*, to the skin and eyes, include aqueous solutions, suspensions, ointments, creams, gels or sprayable formulations, *e.g.*, for delivery by aerosol or the like. Such topical delivery systems will in particular be appropriate for dermal application. They are thus particularly suited for use in topical, including cosmetic, formulations well-known in the art. Such may contain solubilizers, stabilizers, tonicity enhancing agents, buffers and preservatives.

As used herein a topical application may also pertain to an inhalation or to an intranasal application. They may be conveniently delivered in the form of a dry powder (either alone, as a mixture, for example a dry blend with lactose, or a mixed component particle, for example with phospholipids) from a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray, atomizer or nebuliser, with or without the use of a suitable propellant.

The invention further provides pharmaceutical compositions and dosage forms that comprise one or more agents that reduce the rate by which the compound of the present

invention as an active ingredient will decompose. Such agents, which are referred to herein as "stabilizers," include, but are not limited to, antioxidants such as ascorbic acid, pH buffers, or salt buffers, etc.

Method of the invention:

Apelin family of peptides is the only known natural family of ligands for the G protein coupled APJ receptor. Apelin gene encodes a 77 aminoacid polypeptide, which gets processed into biologically active forms of apelin peptides, such as apelin-36, apelin-17, apelin-16, apelin-13, apelin-12 and pyroglutamate modified form of apelin-13 (Pyr^1-apelin-13). Any one of these apelin peptides, upon binding to APJ receptor, transduces the signal via Gi and Gq proteins. In cardiomyocytes, Gi or Gq coupling leads to changes in intracellular pH, PLC activation, and IP3 production that enhance myofilament calcium sensitivity and ultimately result in increased cardiac contractility. Gi coupling inhibits activated Gs, adenylyl cyclase and cAMP production and increases pAkt levels leading to cardioprotection. In vascular endothelial cells, APJ activation via Gi, pAKT leads to increased nitric oxide (NO) production, which increases smooth muscle relaxation resulting in overall vasodilation.

Patients with chronic stable heart failure have occasional acute episodes of decompensation, where cardiac contractility declines further and symptoms worsen. These exacerbations are referred to as acute decompensated heart failure (ADHF). Current therapies for ADHF include diuretics, vasodilators, and inotropes, which directly increase cardiac contractility. Current intravenous inotropes (dobutamine, dopamine, milrinone, levosimendan) are well known for their adverse events such as arrhythmia and increased long-term mortality. The synthetic apelin polypeptide analogs of the instant invention provide a therapy for ADHF that increases cardiac contractility without arrhythmogenic or mortality liabilities and address the enormous unmet medical need in chronic heart failure.

Indeed, acute apelin treatment (5 min) in humans results in coronary vasodilatation and improved cardiac output. However, native apelins exhibit a very short $t_{½}$ (seconds) and duration of action (few minutes) in vivo. The potent synthetic apelin peptide agonists of the instant invention have longer half lives compared to the native apelin.

Activation of APJ receptor in cardiomyocytes a) improve cardiac contractility via Gi / Gq, PLC and Ca2+, and b) provide cardioprotection via Gi, pAkt activation, but without increasing cAMP (as seen with other inotropes). In addition, APJ agonism in endothelial cells leads to arterial vasodilation, which further benefits heart failure by unloading the work

of left ventricle. Taken together the synthetic apelin polypeptide analogs can improve overall cardiac function, reduce arrhythmogenesis and provide survival benefit.

More recently, there have been a number of preclinical research publications focusing on the potential involvement of Apelin in diabetes and insulin resistance. Apelin has been shown to 1) lower blood glucose levels by improving glucose uptake in muscle, adipose and heart, 2) protect pancreatic beta cells from ER stress and subsequent apoptosis, 3) lower the insulin secretion in beta cells, and 4) regulate catecholamine induced lypolysis in adipose tissue. Activation of pAKT pathway has been implicated in these processes.

The polypeptides according to anyone of formulae I to IX, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, exhibit valuable pharmacological properties, e.g. APJ receptor agonsim properties, e.g. as indicated in *in vitro* and *in vivo* tests as provided in the next sections and are therefore indicated for therapy.

Polypeptides of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof, may be useful in the treatment of an indication selected from acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

Thus, as a further embodiment, the present invention provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof for the treatment of a disease which is associated with the APJ receptor activity. In a further embodiment, the therapy is selected from a disease which is responsive to the agonism of the APJ receptor. In another embodiment, the disease is selected from the afore-mentioned list, suitably acute decompensated heart failure. In yet another subset of this embodiment, the present invention provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, ester or a salt thereof, in the manufacture of a medicament, for the treatment of a disease which is associated with the APJ receptor activity.

Thus, as a further embodiment, the present invention provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, in therapy. In a further embodiment, the therapy is selected from a disease which may be treated by activation (agonism) of the APJ receptor.

In another embodiment, the invention provides a method of treating a disease which is responsive to the agonism of the APJ receptor, comprising administration of a therapeutically acceptable amount of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester of a salt thereof. In a further embodiment, the disease is selected from the afore-mentioned list, suitably acute decompensated heart failure.

In yet another subset of this embodiment, the invention provides a method of treating a disease which is associated with the activity of the APJ receptor comprising administration of a therapeutically acceptable amount of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

The effective amount of a pharmaceutical composition or combination of the invention to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the fusion protein variant is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician can titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage can range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage can range from 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the dual function protein in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition can therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages can be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The activity of a polypeptide according to the present invention can be assessed by the following *in vitro* methods described below.

hAPJ Calcium flux assay:

Chem-5 APJ stable cells (Millipore # HTS068C) were plated in 384-well format with 10,000 cells/well in 25 ul growth media, then grown 24 hours in a 37°C tissue culture incubator. One hour before the assay, 25 ul/well FLIPR Calcium 4 dye (Molecular Devices R8142) with 2.5 mM probenecid was added, and cells were incubated one hour in a 37°C tissue culture incubator. Peptides were solubilized in HBSS, HEPES & 0.1% BSA buffer, and serially-diluted 10-fold, from 50 uM to 5 pM, in triplicate. FLIPR Tetra was used to add peptide to the cells with dye (1:5, for final peptide concentrations ranging from 10 uM to 1 pM). FLIPR dye inside the cells emitted fluorescence after binding to calcium, while fluorescence from outside the cells was masked. Fluorescence was measured using 470-495 excitation and 515-575 emission wavelengths on the FLIPR Tetra. Readings were done for 3 minutes total, beginning 10 seconds before the peptide addition. Maximum-minimum values were calculated and plotted for each peptide concentration, and GraphPad prism software was used to calculate EC_{50} values at the curve inflection points, for calcium flux stimulation by peptides.

Plasma stability assay:

Materials:

Working solution: 1 mg/mL test article is prepared in Milli-Q water

Extraction solution: Methanol:Acetonitrile:Water (1:1:1) with 0.1% Formic Acid and 400 ng/mL Glyburide.

Plasma: Male Sprague-Dawley rat plasma (with sodium heparin), purchased from Bioreclamation LLC (Liverpool, NY).

Whole blood: Male Sprague Dawley whole blood (with sodium heparin), purchased from Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

Lung homogenate: Male rat Sprague Dawley lung was purchased from Bioreclamation LLC (Liverpool, NY). The lung was homogenized using polytron homogenizer after addition of 5x volume of 1X PBS. The homogenate was centrifuged at 9000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged again at 3000 rpm for 30 min to make a clear supernatant. Protein concentration was determined using a commercial kit (Pierce, Thermo Scientific).

Sample Preparation Procedure:

Test article was prepared in one of the following biological matrices: heparinized rat plasma, heparinized rat whole blood or lung homogenate. The plasma and whole blood

sample was prepared at 5000 ng/mL by adding 5 uL of 1 mg/mL Working solution to 995 uL of rat plasma or whole blood. Lung homogenate samples were prepared by diluting lung homogenate to 1 mg/ml protein concentration with phosphate buffered saline (PBS), followed by addition of 5 uL Working solution to 995 uL diluted lung homogenate. The samples were incubated at 37°C with gentle shaking (65~75rpm) in a water bath incubator. At times 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 and 240 min, 25 uL aliquots of incubation samples were transferred to 96-well plate and immediately protein precipitated using 150 uL of Extraction solution. After completion of incubation experiment, the sample plate was centrifuged at 4000 rpm at 4 oC for 10 minutes. Afterwards, a pipetting device (Tecan Temo) was used to tranfer the supernatants to another plate and add 50 uL of water to all samples. The plate was vortexed prior to LC-MS analysis.

LC-MS Analysis of stability samples
HPLC: Agilent 1290 HPLC with autosampler
Column: MAC-MOD ACE C18, 3 µm, 30mm x 2.1mm i.d.
Mobile phase A: 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mobile phase B: 0.1% Formic acid in water

Gradient Program:

Time (min)	Flow (mL)	Mobile Phase A(%)	Mobile Phase 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

Mass spectrometer: Agilent Q-TOF 6530
Data acquisition mode: Full scan with mass range of 100 – 1000 m/z
Data acquisition and analysis software: MassHunter

Data Analysis:
Stability assay: stability half-life, (t ½), values were determined by converting peak areas at each time point to percent remaining relative to initial (t=0) peak area.

Percent remaining = 100 x (sample peak area) ÷ (t = 0 peak area)
The natural log of percent remaining values were calculated and plotted against sample time (Microsoft Excel). The slope of this line, k, was determined by linear regression (Microsoft Excel).
Stability half-life was then calculated by the formula, t ½ = 0.693 ÷ k

Surrogate activity-based plasma stability assay:

The calcium flux protocol described above was followed, with the following changes. The peptides were also incubated with 5% rat plasma (Bioreclamation # RATPLNAHP-M, Na Heparin-treated). Readings were taken at time points t_0 and t_{24} hrs, after incubation in a 37°C tissue culture incubator. Peptide plasma half-life in minutes was estimated by calculating the following:

1) LN((EC_{50} at t_0)/ (EC_{50} at $t_{24\ hrs}$)),
2) Calculate slope of value above and
3) $t_{1/2}$ = 0.693/(slope^2).

Using the test assay (as described above) polypeptides of the invention exhibited efficacy and stability in accordance to Tables 2 and 3, provided *infra*.

Table 2: Activity and Stability of Polypeptides

Peptide	**hAPJ Ca^{2+} Flux EC_{50} [nM]**	**Surrogate activity-based Plasma stability t½ [min]**
Example 1	90.13	30.7
Example 2	132.58	27.1
Example 3	1008.19	98.0
Example 4	746.74	50.0
Example 5	21.25	126.2
Example 6	21.98	117.2
Example 7	90.85	>1000
Example 8	1.04	407
Example 9	2.16	>1000

Example 10	2.54	>1000
Example 11	3.52	>1000
Example 12	2.07	93.6
Example 13	2.26	283.6
Example 14	8.83	85.2
Example 15	3.53	180.3
Example 16	1.43	13.4
Example 17	3.29	14.1
Example 18	1.62	248.1
Example 19	8.46	28.4
Example 20	173.24	490.4
Example 21	75.81	639.7
Example 22	42.03	799.9
Example 23	52.42	>1000
Example 24	32.65	303.5
Example 25	24.50	>1000
Example 26	29.84	>1000
Example 27	65.55	>1000
Example 28	5.68	440.3
Example 29	4.33	216.6
Example 30	6.05	>1000
Example 31	84.11	>1000
Example 32	518.08	>1000
Example 33	8.10	>1000
Example 34	3.21	505.2
Example 35	11.12	>1000
Example 36	7.36	>1000
Example 37	1.40	164.3
Example 38	181.77	>1000
Example 39	8.20	654.9
Example 40	7.99	>1000
Example 41	6.91	627.1
Example 42	92.77	>1000

Example 43	4.14	>1000
Example 44	5.94	855.8
Example 45	6.55	167.3
Example 46	3.87	502.1
Example 47	2.41	418.9
Example 48	4.10	546.4
Example 49	34.19	>1000
Example 50	1.92	>1000
Example 51	1.09	655.9
Example 52	53.88	777.8
Example 53	1.07	>1000
Example 54	6.70	>1000
Example 55	8.16	>1000
Example 56	1.12	>1000
Example 57	2.01	>1000
Example 58	13.09	>1000
Example 59	10.00	>1000
Example 60	8.15	>1000
Example 61	89.15	259.9
Example 62	3.32	>1000
Example 63	3.18	703.9
Example 64	6.3	455
Example 65	1.1	596
Example 66	589	596
Comparative Example: Pyr1-apelin-13	1.79	5.0

Table 3: Correlation bewteen plasma stabililty Assay and Surrogate Activity based Plasma Stability assay:

Peptide	Plasma stability t½ [min]	Surrogate Activity based Plasma stability t½ [min]
Example 8	163	407
Example 12	53.9	96.16
Example 13	183	283.6
Example 14	63	85.2
Example 16	10.2	13.4
Example 17	2.3	14.1
Example 18	220	248.1
Pyr-1-Apelin 13	6.6	5.0

The polypeptide of the present invention may have an APJ receptor potency similar to apelin-13 or pyr-1-apelin-13. In one embodiment the polypeptide of the present invention has an EC_{50} of less than 100nM. In another embodiment the polypeptide of the invention has an EC_{50} of less than 50nM, preferably less than 25nM and more preferably less than 15nM. In yet another embodiment, the polypeptide of the present invention has an EC_{50} of less than 10nM.

The polypeptide of the present invention may have plasma stability superior to apelin-13 or pyr-1-apelin-13. In one embodiment, the plasma stability improvement is at least 2 fold. In one embodiment, the polypeptide of the invention has a plasma stability of at least 30 minutes. In another embodiment, the polypeptide of the invention has a plasma stability of at least 10 minutes, at least 40 min and more preferably at least 60 minutes.

The polypeptide of the present invention may be administered either simultaneously with, or before or after, one or more other therapeutic agent. The polypeptide of the present invention may be administered separately, by the same or different route of administration, or together in the same pharmaceutical composition as the other agents.

In one embodiment, the invention provides a product comprising a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester of a salt thereof, and at least one other therapeutic agent as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential use in therapy. In one embodiment, the therapy is the treatment of a disease or condition responsive to the activation of the APJ receptor.

Products provided as a combined preparation include a composition comprising a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester of a salt thereof, and the other therapeutic agent(s) together in the same pharmaceutical composition, or a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, and the other therapeutic agent(s) in separate form, *e.g.* in the form of a kit.

In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, and another therapeutic agent(s). Optionally, the pharmaceutical composition may comprise a pharmaceutically acceptable excipient, as described above.

In one embodiment, the invention provides a kit comprising two or more separate pharmaceutical compositions, at least one of which contains a polypeptide of anyone of formula I' and I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof. In one embodiment, the kit comprises means for separately retaining said compositions, such as a container, divided bottle, or divided foil packet. An example of such a kit is a blister pack, as typically used for the packaging of tablets, capsules and the like.

The kit of the invention may be used for administering different dosage forms, for example, oral and parenteral, for administering the separate compositions at different dosage intervals, or for titrating the separate compositions against one another. To assist compliance, the kit of the invention typically comprises directions for administration.

In the combination therapies of the invention, the compound of the invention and the other therapeutic agent may be manufactured and/or formulated by the same or different manufacturers. Moreover, the compound of the invention and the other therapeutic may be brought together into a combination therapy: (i) prior to release of the combination product to physicians (*e.g.* in the case of a kit comprising the compound of the invention and the other therapeutic agent); (ii) by the physician themselves (or under the guidance of the physician) shortly before administration; (iii) in the patient themselves, *e.g.* during sequential administration of a polypeptide of the invention and the other therapeutic agent.

Accordingly, the invention provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, for treating a disease or condition responsive to

the agonism of the APJ receptor, wherein the medicament is prepared for administration with another therapeutic agent. The invention also provides the use of another therapeutic agent for treating a disease or condition responsive to the agonism of the apelin receptor, wherein the medicament is administered with a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

The invention also provides a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for use in a method of treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, is prepared for administration with another therapeutic agent. The invention also provides another therapeutic agent for use in a method of treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the other therapeutic agent is prepared for administration with a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof. The invention also provides a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, for use in a method of treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, is administered with another therapeutic agent. The invention also provides another therapeutic agent for use in a method of treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the other therapeutic agent is administered with a polypeptide of anyone of formulae I to IX or an amide, an ester or a salt thereof.

The invention also provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, for treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the patient has previously (*e.g.* within 24 hours) been treated with another therapeutic agent. The invention also provides the use of another therapeutic agent for treating a disease or condition responsive to the agonism of the APJ receptor, wherein the patient has previously (*e.g.* within 24 hours) been treated with a polypeptide of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

In one embodiment, the other therapeutic agent is selected from inotropes, beta adrenergic receptor blockers, HMG-Co-A reductase inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, angiotensin converting enzyme (ACE) Inhibitors, calcium channel blockers (CCB), endothelin antagonists, renin inhibitors, diuretics, ApoA-I mimics, anti-diabetic agents, obesity-reducing agents, aldosterone receptor blockers, endothelin receptor blockers, aldosterone synthase inhibitors (ASI), a CETP inhibitor, anti-coagulants, relaxin, BNP (nesiritide) and a NEP inhibitor.

The term “in combination with” a second agent or treatment includes co-administration of the polypeptide of the invention (*e.g.*, a polypeptide according to anyone of Formulae I-IX or a polypeptide otherwise described herein) with the second agent or treatment, administration of the compound of the invention first, followed by the second agent or treatment and administration of the second agent or treatment first, followed by the compound of the invention.

The term “second agent” includes any agent which is known in the art to treat, prevent, or reduce the symptoms of a disease or disorder described herein, *e.g* .a disorder or disease responsive to the actvation of the APJ receptor, such as for example, acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

Examples of second agents include inotropes, beta adrenergic receptor blockers, HMG-Co-A reductase inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, angiotensin converting enzyme (ACE) Inhibitors, calcium channel blockers (CCB), endothelin antagonists, renin inhibitors, diuretics, ApoA-I mimics, anti-diabetic agents, obesity-reducing agents, aldosterone receptor blockers, endothelin receptor blockers, aldosterone synthase inhibitors (ASI), a CETP inhibitor, anti-coagulants, relaxin, BNP (nesiritide) and/or a NEP inhibitor.

Inotropes as used herein include for example dobutamine, isoproterenol, milrinone, amirinone, levosimendan, epinephrine, norepinephrine, isoproterenol and digoxin.

Beta adrenergic receptor blockers as used herein include for example acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol and timolol.

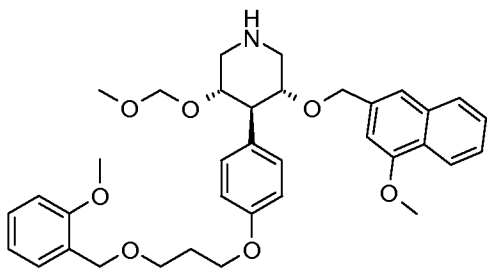
Anti-coagulants as used herein include Dalteparin, Danaparoid, Enoxaparin, Heparin, Tinzaparin, Warfarin.

The term “HMG-Co-A reductase inhibitor” (also called beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-co-enzyme-A reductase inhibitors) includes active agents that may be used to lower the lipid levels including cholesterol in blood. Examples include atorvastatin, cerivastatin, compactin, dalvastatin, dihydrocompactin, fluindostatin, fluvastatin, lovastatin, pitavastatin, mevastatin, pravastatin, rosuvastatin, rivastatin, simvastatin, and velostatin, or, pharmaceutically acceptable salts thereof.

The term “ACE-inhibitor” (also called angiotensin converting enzyme inhibitors) includes molecules that interrupt the enzymatic degradation of angiotensin I to angiotensin II. Such compounds may be used for the regulation of blood pressure and for the treatment of congestive heart failure. Examples include alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, and trandolapril, or, pharmaceutically acceptables salt thereof.

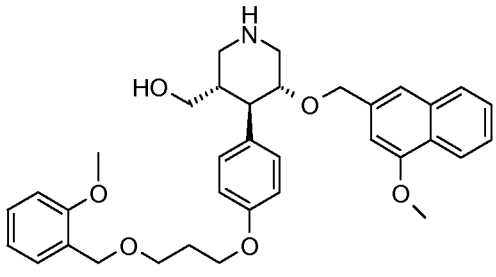
The term “endothelin antagonist” includes bosentan (cf. EP 526708 A), tezosentan (cf. WO 96/19459), or, pharmaceutically acceptable salts thereof.

The term “renin inhibitor” includes ditekiren (chemical name: [1*S*-[1*R**,2*R**,4*R**(1*R**,2*R**)]]-1-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]-L-proly l-L-phenylalanyl-N-[2-hydroxy-5-methyl-1-(2-methylpropyl)-4-[[[2-methyl-1-[[(2-pyridinylmrthyl)amino]carbonyl]butyl]amino]carbonyl]hexyl]-*N*-alfa-methyl-L-histidinamide); terlakiren (chemical name: [*R*-(*R**,*S**)]-N-(4-morpholinylcarbonyl)-L-phenylalanyl-N-[1-(cyclohexylmethyl)-2-hydroxy-3-(1-methylethoxy)-3-oxopropyl]-S-methyl-L-cysteineamide); Aliskiren (chemical name: (2*S*,4*S*,5*S*,7*S*)-5-amino-*N*-(2-carbamoyl-2,2-dimethylethyl)-4-hydroxy-7-{[4-methoxy-3-(3-methoxypropoxy) phenyl]methyl}-8-methyl-2-(propan-2-yl)nonanamide) and zankiren (chemical name: [1*S*-[1*R**[*R**(*R**)],2*S**,3*R**]]-*N*-[1-(cyclohexylmethyl)-2,3-dihydroxy-5-m ethylhexyl]-alfa-[[2-[[(4-methyl-1-piperazinyl)sulfonyl]methyl]-1-oxo-3-phenylpropyl]-amino]-4-thiazolepropanamide), or, hydrochloride salts thereof, or, SPP630, SPP635 and SPP800 as developed by Speedel, or RO 66-1132 and RO 66-1168 of Formula (A) and (B):



(A)

and



(B)

, or, pharmaceutically acceptable salts thereof.

The term “aliskiren”, if not defined specifically, is to be understood both as the free base and as a salt thereof, especially a pharmaceutically acceptable salt thereof, most preferably a hemi-fumarate salt thereof.

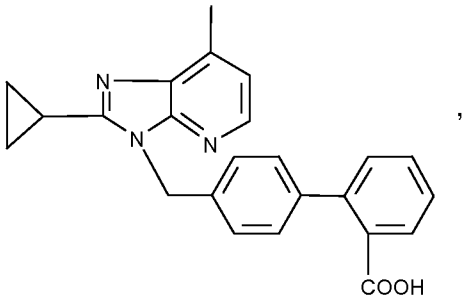
The term “calcium channel blocker (CCB)” includes dihydropyridines (DHPs) and non-DHPs (*e.g.*, diltiazem-type and verapamil-type CCBs). Examples include amlodipine, Bepridil, Diltiazem, felodipine, ryosidine, isradipine, lacidipine, nicardipine, nifedipine, niguldipine, niludipine, nimodipine, nisoldipine, nitrendipine, Verapamil and nivaldipine, and is preferably a non-DHP representative selected from the group consisting of flunarizine, prenylamine, diltiazem, fendiline, gallopamil, mibefradil, anipamil, tiapamil and verapamil, or, pharmaceutically acceptable salts thereof. CCBs may be used as anti-hypertensive, anti-angina pectoris, or anti-arrhythmic drugs.

The term “diuretic” includes thiazide derivatives (*e.g.*, chlorothiazide, hydrochlorothiazide, methylclothiazide, and chlorothalidon).

The term “ApoA-I mimic” includes D4F peptides (*e.g.*, formula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)

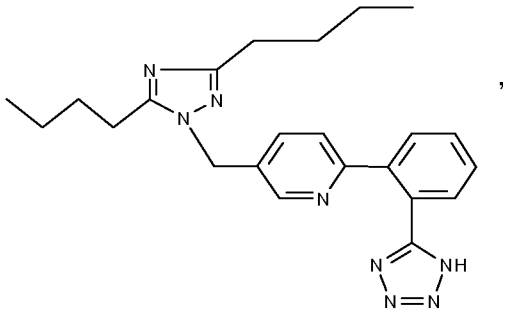
An angiotensin II receptor antagonist or a pharmaceutically acceptable salt thereof is understood to be an active ingredient which bind to the AT_1-receptor subtype of angiotensin II receptor but do not result in activation of the receptor. As a consequence of the inhibition of the AT_1 receptor, these antagonists can, for example, be employed as antihypertensives or for treating congestive heart failure.

The class of AT_1 receptor antagonists comprises compounds having differing structural features, essentially preferred are the non-peptidic ones. For example, mention may be made of the compounds which are selected from the group consisting of valsartan, losartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, saprisartan, tasosartan, telmisartan, the compound with the designation E-1477 of the following formula



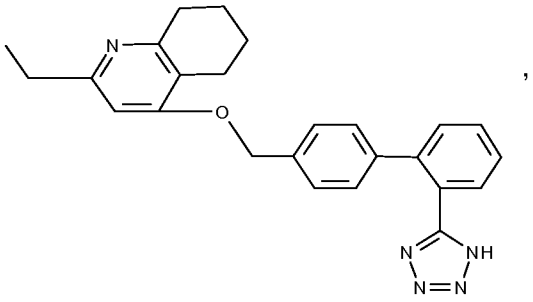
,

the compound with the designation SC-52458 of the following formula



,

and the compound with the designation ZD-8731 of the following formula

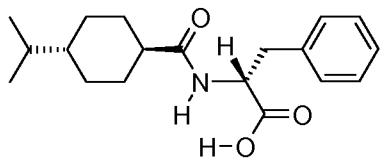


,

or, in each case, a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Preferred AT_1-receptor antagonist are candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan, valsartan. Also prefered are those agents which have been marketed, most preferred is valsartan or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The term “anti-diabetic agent” includes insulin secretion enhancers that promote the secretion of insulin from pancreatic β-cells. Examples include biguanide derivatives (*e.g.*, metformin), sulfonylureas (SU) (*e.g.*, tolbutamide, chlorpropamide, tolazamide, acetohexamide, 4-chloro-*N*-[(1-pyrolidinylamino)carbonyl]-benzensulfonamide (glycopyramide), glibenclamide (glyburide), gliclazide, 1-butyl-3-metanilylurea, carbutamide, glibonuride, glipizide, gliquidone, glisoxepid, glybuthiazole, glibuzole, glyhexamide, glymidine, glypinamide, phenbutamide, and tolylcyclamide), or pharmaceutically acceptable salts thereof. Further examples include phenylalanine derivatives (*e.g.*, nateglinide [*N*-(*trans*-4-isopropylcyclohexylcarbonyl)-*D*-phenylalanine] (cf. EP 196222 and EP 526171) of the formula



;

repaglinide [(*S*)-2-ethoxy-4-{2-[[3-methyl-1-[2-(1-piperidinyl)phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl}benzoic acid] (cf. EP 589874, EP 147850 A2, in particular Example 11 on page 61,

and EP 207331 A1); calcium (2*S*)-2-benzyl-3-(*cis*-hexahydro-2-isoindolinlycarbonyl)-propionate dihydrate (*e.g.*, mitiglinide (cf. EP 507534)); and glimepiride (cf. EP 31058).

Further examples of second agents with which the peptide and polypeptide of the invention can be used in combination include DPP-IV inhibitors, GLP-1 and GLP-1 agonists.

DPP-IV is responsible for inactivating GLP-1. More particularly, DPP-IV generates a GLP-1 receptor antagonist and thereby shortens the physiological response to GLP-1. GLP-1 is a major stimulator of pancreatic insulin secretion and has direct beneficial effects on glucose disposal.

The DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV) inhibitor can be peptidic or, preferably, non-peptidic. DPP-IV inhibitors are in each case generically and specifically disclosed *e.g.* in WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, WO 00/34241 and WO 95/15309, in each case in particular in the compound claims and the final products of the working examples, the subject-matter of the final products, the pharmaceutical preparations and the claims are hereby incorporated into the present application by reference to these publications. Preferred are those compounds that are specifically disclosed in Example 3 of WO 98/19998 and Example 1 of WO 00/34241, respectively.

GLP-1 (glucagon like peptide-1) is an insulinotropic protein which is described, *e.g.*, by W.E. Schmidt et al. in *Diabetologia*, 28, 1985, 704-707 and in US 5,705,483.

The term “GLP-1 agonists” includes variants and analogs of GLP-1(7-36)NH_2 which are disclosed in particular in US 5,120,712, US 5,118666, US 5,512,549, WO 91/11457 and by C. Orskov et al in J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826. Further examples include GLP-1(7-37), in which compound the carboxy-terminal amide functionality of Arg^{36} is displaced with Gly at the 37th position of the GLP-1(7-36)NH_2 molecule and variants and analogs thereof including GLN^9-GLP-1(7-37), D-GLN^9-GLP-1(7-37), acetyl LYS^9-GLP-1(7-37), LYS^{18}-GLP-1(7-37) and, in particular, GLP-1(7-37)OH, VAL^8-GLP-1(7-37), GLY^8-GLP-1(7-37), THR^8-GLP-1(7-37), MET^8-GLP-1(7-37) and 4-imidazopropionyl-GLP-1. Special preference is also given to the GLP agonist analog exendin-4, described by Greig *et al.* in Diabetologia 1999, 42, 45-50.

Also included in the definition “anti-diabetic agent” are insulin sensitivity enhancers which restore impaired insulin receptor function to reduce insulin resistance and consequently enhance the insulin sensitivity. Examples include hypoglycemic thiazolidinedione derivatives (*e.g.*, glitazone, (*S*)-((3,4-dihydro-2-(phenyl-methyl)-2*H*-1-benzopyran-6-yl)methyl-thiazolidine-2,4-dione (englitazone), 5-{[4-(3-(5-methyl-2-phenyl-4-oxazolyl)-1-oxopropyl)-phenyl]-methyl}-thiazolidine-2,4-dione (darglitazone), 5-{[4-(1-methyl-

cyclohexyl)methoxy)-phenyl]methyl}-thiazolidine-2,4-dione (ciglitazone), 5-{[4-(2-(1-indolyl)ethoxy)phenyl]methyl}-thiazolidine-2,4-dione (DRF2189), 5-{4-[2-(5-methyl-2-phenyl-4-oxazolyl)-ethoxy)]benzyl}-thiazolidine-2,4-dione (BM-13.1246), 5-(2-naphthylsulfonyl)-thiazolidine-2,4-dione (AY-31637), bis{4-[(2,4-dioxo-5-thiazolidinyl)methyl]phenyl}methane (YM268), 5-{4-[2-(5-methyl-2-phenyl-4-oxazolyl)-2-hydroxyethoxy]benzyl}-thiazolidine-2,4-dione (AD-5075), 5-[4-(1-phenyl-1-cyclopropanecarbonylamino)-benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-dihydroindol-1-yl)ethoxy)phenyl]methyl}-thiazolidine-2,4-dione, 5-[3-(4-chloro-phenyl])-2-propynyl]-5-phenylsulfonyl)thiazolidine-2,4-dione, 5-[3-(4-chlorophenyl])-2-propynyl]-5-(4-fluorophenyl-sulfonyl)thiazolidine-2,4-dione, 5-{[4-(2-(methyl-2-pyridinyl-amino)-ethoxy)phenyl]methyl}-thiazolidine-2,4-dione (rosiglitazone), 5-{[4-(2-(5-ethyl-2-pyridyl)ethoxy)phenyl]-methyl}thiazolidine-2,4-dione (pioglitazone), 5-{[4-((3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2*H*-1-benzopyran-2-yl)methoxy)-phenyl]-methyl}-thiazolidine-2,4-dione (troglitazone), 5-[6-(2-fluoro-benzyloxy)naphthalen-2-ylmethyl]-thiazolidine-2,4-dione (MCC555), 5-{[2-(2-naphthyl)-benzoxazol-5-yl]-methyl}thiazolidine-2,4-dione (T-174) and 5-(2,4-dioxothiazolidin-5-ylmethyl)-2-methoxy-N-(4-trifluoromethyl-benzyl)benzamide (KRP297)).

Further anti-diabetic agents include, insulin signalling pathway modulators, like inhibitors of protein tyrosine phosphatases (PTPases), antidiabetic non-small molecule mimetic compounds and inhibitors of glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT); compounds influencing a dysregulated hepatic glucose production, like inhibitors of glucose-6-phosphatase (G6Pase), inhibitors of fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-Bpase), inhibitors of glycogen phosphorylase (GP), glucagon receptor antagonists and inhibitors of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK); pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) inhibitors; inhibitors of gastric emptying; insulin; inhibitors of GSK-3; retinoid X receptor (RXR) agonists; agonists of Beta-3 AR; agonists of uncoupling proteins (UCPs); non-glitazone type PPARγ agonists; dual PPARα / PPARγ agonists; antidiabetic vanadium containing compounds; incretin hormones, like glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and GLP-1 agonists; beta-cell imidazoline receptor antagonists; miglitol; α_2-adrenergic antagonists; and pharmaceutically acceptable salts thereof.

In one embodiment, the invention provides a combination, in particular a pharmaceutical combination, comprising a therapeutically effective amount of the polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, and one or more therapeutically active agents selected from β-adrenergic receptor blockers such as acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol,

sotalol and timolol; angiotensin II receptor antagonists such as AT1 blockers; antidiabetic agents such as DPPIV inhibitors (e.g. vildagliptin) and GLP1 peptide agonist.

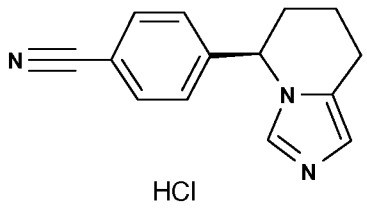
The term “obesity-reducing agent” includes lipase inhibitors (*e.g.*, orlistat) and appetite suppressants (*e.g.*, sibutramine and phentermine).

An aldosterone synthase inhibitor or a pharmaceutically acceptable salt thereof is understood to be an active ingredient that has the property to inhibit the production of aldosterone. Aldosterone synthase (CYP11B2) is a mitochondrial cytochrome P450 enzyme catalyzing the last step of aldosterone production in the adrenal cortex, i.e., the conversion of 11-deoxycorticosterone to aldosterone. The inhibition of the aldosterone production with so-called aldosterone synthase inhibitors is known to be a successful variant to treatment of hypokalemia, hypertension, congestive heart failure, atrial fibrillation or renal failure. Such aldosterone synthase inhibition activity is readily determined by those skilled in the art according to standard assays (*e.g.*, US 2007/0049616).

The class of aldosterone synthase inhibitors comprises both steroidal and non-steroidal aldosterone synthase inhibitors, the later being most preferred.

Preference is given to commercially available aldosterone synthase inhibitors or those aldosterone synthase inhibitors that have been approved by the health authorities.

The class of aldosterone synthase inhibitors comprises compounds having differing structural features. An example of non-steroidal aldosterone synthase inhibitor is the (+)-enantiomer of the hydrochloride of fadrozole (US patents 4617307 and 4889861) of formula



.

or, if appropriable, a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Aldosterone synthase inhibitors useful in said combination are compounds and analogs generically and specifically disclosed e.g. in US2007/0049616, in particular in the compound claims and the final products of the working examples, the subject-matter of the final products, the pharmaceutical preparations and the claims are hereby incorporated into the present application by reference to this publication. Preferred aldosterone synthase inhibitors suitable for use in the present invention include, without limitation 4-(6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)-3-methylbenzonitrile; 5-(2-chloro-4-cyanophenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazole-5-carboxylic acid (4-methoxybenzyl)methylamide; 4’-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-yl)biphenyl-3-carbonitrile; 5-(4-Cyano-2-

methoxyphenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-c]imidazole-5-carboxylic acid butyl ester; 4-(6,7-Dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)-2-methoxybenzonitrile; 5-(2-Chloro-4-cyanophenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazole-5-carboxylic acid 4-fluorobenzyl ester; 5-(4-Cyano-2-trifluoromethoxyphenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-c]imidazole-5-carboxylic acid methyl ester; 5-(4-Cyano-2-methoxyphenyl)-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazole-5-carboxylic acid 2-isopropoxyethyl ester; 4-(6,7-Dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)-2-methylbenzonitrile; 4-(6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)-3-fluorobenzonitrile ; 4-(6,7-Dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)-2-methoxybenzonitrile; 3-Fluoro-4-(7-methylene-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazol-5-yl)benzonitrile; *cis*-3-Fluoro-4-[7-(4-fluoro-benzyl)-5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,5-a]pyridin-5-yl]benzonitrile; 4'-Fluoro-6-(9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-yl)biphenyl-3-carbonitrile; 4'-Fluoro-6-(9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-yl)biphenyl-3-carbonitrile or in each case, the (R) or (S) enantiomer thereof; or if appropriable, a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The term aldosterone synthase inhibitors also include compounds and analogs disclosed in WO2008/076860, WO2008/076336, WO2008/076862, WO2008/027284, WO2004/046145, WO2004/014914, WO2001/076574.

Furthermore Aldosterone synthase inhibitors also include compounds and analogs disclosed in U.S. patent applications US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 and in PCT applications WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 and in European patent application EP 1886695. Preferred aldosterone synthase inhibitors suitable for use in the present invention include, without limitation 8-(4-Fluorophenyl)-5,6-dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c1[1 ,41oxazine; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)-2-fluorobenzonitrile; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)-2,6-difluorobenzonitrile; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)-2-methoxybenzonitrile; 3-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)benzonitrile; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)phthalonitrile; 4-(8-(4-Cyanophenyl)-5,6-dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)benzonitrile; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)benzonitrile; 4-(5,6-Dihydro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-yl)naphthalene-1-carbonitrile; 8-[4-(1*H*-Tetrazol-5-yl)phenyl1-5,6-dihvdro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazine as developed by Speedel or in each case, the (R) or (S) enantiomer thereof; or if appropriable, a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Aldosterone synthase inhibitors useful in said combination are compounds and analogs generically and specifically disclosed e.g. in WO 2009/156462 and WO

2010/130796, in particular in the compound claims and the final products of the working examples, the subject-matter of the final products, the pharmaceutical preparations and the claims. Preferred Aldosterone Synthase inhibitors suitable for combination in the present invention include, 3-(6-Fluoro-3-methyl-2-pyridin-3-yl-1*H*-indol-1-ylmethyl)-benzonitrile hydrochloride, 1-(4-Methanesulfonyl-benzyl)-3-methyl-2-pyridin-3-yl-1*H*-indole, 2-(5-Benzyloxy-pyridin-3-yl)-6-chloro-1-methyl-1H-indole, 5-(3-Cyano-1-methyl-1*H*-indol-2-yl)-nicotinic acid ethyl ester, *N*-[5-(6-chloro-3-cyano-1-methyl-1*H*-indol-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-ethanesulfonamide, Pyrrolidine-1-sulfonic acid 5-(6-chloro-3-cyano-1-methyl-1*H*-indol-2-yl)-pyridin-3-yl ester, *N*-Methyl-*N*-[5-(1-methyl-1*H*-indol-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-methanesulfonamide, 6-Chloro-1-methyl-2-{5-[(2-pyrrolidin-1-yl-ethylamino)-methyl]-pyridin-3-yl}-1H-indole-3-carbonitrile, 6-Chloro-2-[5-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-pyridin-3-yl]-1-methyl-1H-indole-3-carbonitrile, 6-Chloro-1-methyl-2-{5-[(1-methyl-piperidin-4-ylamino)-methyl]-pyridin-3-yl}-1H-indole-3-carbonitrile, Morpholine-4-carboxylic acid [5-(6-chloro-3-cyano-1-methyl-1H-indol-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-amide, *N*-[5-(6-Chloro-1-methyl-1H-indol-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-ethanesulfonamide, *C,C,C*-Trifluoro-N-[5-(1-methyl-1*H*-indol-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-methanesulfonamide, N-[5-(3-Chloro-4-cyano-phenyl)-pyridin-3-yl]-4-trifluoromethyl-benzenesulfonamide, N-[5-(3-Chloro-4-cyano-phenyl)-pyridin-3-yl]-1-phenyl-methanesulfonamide, N-(5-(3-chloro-4-cyanophenyl)pyridin-3-yl)butane-1-sulfonamide, N-(1-(5-(4-cyano-3-methoxyphenyl)pyridin-3-yl)ethyl)ethanesulfonamide, N-((5-(3-chloro-4-cyanophenyl)pyridin-3-yl)(cyclopropyl)methyl)ethanesulfonamide, N-(cyclopropyl(5-(1*H*-indol-5-yl)pyridin-3-yl)methyl)ethanesulfonamide, N-(cyclopropyl(5-naphtalen-1-yl-pyridin-3-yl)methyl)ethanesulfonamide, Ethanesulfonic acid [5-(6-chloro-1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-2-yl)-pyridin-3-ylmethyl]-amide and Ethanesulfonic acid {[5-(3-chloro-4-cyano-phenyl)-pyridin-3-yl]-cyclopropyl-methyl}-ethyl-amide.

The term “endothelin receptor blocker” includes bosentan and ambrisentan.

The term “CETP inhibitor” refers to a compound that inhibits the cholesteryl ester transfer protein (CETP) mediated transport of various cholesteryl esters and triglycerides from HDL to LDL and VLDL. Such CETP inhibition activity is readily determined by those skilled in the art according to standard assays (*e.g.*, U.S. Pat. No. 6,140,343). Examples include compounds disclosed in U.S. Pat. No. 6,140,343 and U. S. Pat. No. 6,197,786 (*e.g.*, [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluoromethyl-benzyl)-methoxycarbonyl- amino]-2-ethyl-6-trifluoromethyl-3,4-dihydro-2H-quinoline-1-carboxylic acid ethyl ester (torcetrapib); compounds disclosed in U.S. Pat. No. 6,723,752 (*e.g.*, (2R)-3-{[3-(4-Chloro-3-ethyl-phenoxy)-phenyl]-[[3-(1,1,2,2-

tetrafluoro-ethoxy)-phenyl]-methyl]-amino}-1,1,1-trifluoro-2-propanol); compounds disclosed in U.S. patent application Ser. No. 10/807,838; polypeptide derivatives disclosed in U.S. Pat. No. 5,512,548; rosenonolactone derivatives and phosphate-containing analogs of cholesteryl ester disclosed in *J. Antibiot.,* 49(8): 815- 816 (1996), and *Bioorg. Med. Chem. Lett.;* 6:1951-1954 (1996), respectively. Furthermore, the CETP inhibitors also include those disclosed in WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, WO 2007/128568, WO2008/009435, WO 2009/059943 and WO2009/071509.

The term "NEP inhibitor" refers to a compound that inhibits neutral endopeptidase (NEP) EC 3.4.24.11. Examples include Candoxatril, Candoxatrilat, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Sampatrilat, Fasidotril, Omapatrilat, Gemopatrilat, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 and and (2R,4S)-5-Biphenyl-4-yl-4-(3-carboxy-propionylamino)-2-methyl-pentanoic acid ethyl ester or a pharmaceutically acceptable salt thereof. NEP inhibitors also include Phosphono/biaryl substituted dipeptide derivatives, as disclosed in US patent Number US 5,155,100. NEP inhibitors also include N-mercaptoacyl phenylalanine derivative as disclosed in PCT application Number WO 2003/104200. NEP inhibitors also include dual-acting antihypertensive agents as disclosed in PCT application Numbers WO 2008/133896, WO 2009/035543 or WO 2009/134741. Other examples include compounds disclosed in US application Number 12/788,794; 12/788,766 and 12/947,029. NEP inhibitors also include compounds disclosed in WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 and US provisional applications No 61/414171 and 61/414163.

In one embodiment, the invention provides a method of activating the APJ receptor in a subject, wherein the method comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of the polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

In one embodiment, the invention provides a method of treating a disorder or a disease responsive to the activation of the APJ receptor, in a subject, wherein the method comprises administering to the subject a therapeutically effective amount of the polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof.

In one embodiment, the invention provides a method of treating a disorder or a disease responsive to the activation (agonism) of the APJ receptor, in a subject, wherein the disorder or the disease is selected from acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular

tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

In one embodiment, the invention provides a polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, for use as a medicament.

In one embodiment, the invention provides the use of a polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, in the manufacture of a medicament , for the treatment of a disorder or disease responsive to the activation of the APJ receptor. In another embodiment, the invention provides the use of a polypeptide according to the definition of anyone of formulae I to IX, or an amide, an ester or a salt thereof, in the manufacture of a medicament , for the treatment of a disorder or disease responsive to the activation of the APJ receptor, wherein said disorder or disease is in particular selected from acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

Exemplification of the invention: peptide and polypeptide synthesis

Abbreviation	Definition
AA	Amino acid
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
ACN	Acetonitrile
AcOH	Acetic acid
Ac_2O	Acetic anhydride
AM	Aminomethyl
BAL	Backbone amide linker
BSA	Bovine Serum Albumin
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
DCM	Dichlormethane
DIC	*N,N'*-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	*N,N*'-Diisopropylethylamine
DMA	*N,N*'-Dimethylacetamide
DMF	*N,N'*-Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DVB	Divinylbenzene
EDT	Ethanedithiol
FA	Formic acid
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HATU	2-(1H-9-Azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCTU	2-(6-Chloro-1H-Benzotriazole-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography
ivDde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl

LN	Logarithmus naturali (natural logarithm)
MeOH	Methanol
MS	Mass spectrometry
Nal	2-Naphthylalanine
Nle	Norleucine
NMP	N-Methylpyrrolidine
Oxyma Pure	Ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
*p*E	Pyroglutamate
PG	Protecting group
Ph	Phenyl
PS	Polystyrene
POL	Polymer support
rt	Room temperature
SPPS	Solid phase peptide synthesis
*t*BuOH	*tert*-Butanol
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilane
t_R	Retention time
Trt	Trityl
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviolet

The peptides were synthesized by standard solid phase Fmoc chemistry. The peptides were assembled on the Prelude™ peptide synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, USA). Peptides with a free carboxylic acid on the C-terminus were synthesized from 2-chlorotrityl chloride-PS-resin (ABCR, Karlsruhe, Germany). Peptides with an unsubstituted carboxamide on the C-terminus were synthesized from Fmoc protected Rink-Amide-AM-PS-resin (Merck, Darmstadt, Germany). Peptides with an N-monosubstituted carboxamide on the C-terminus were synthesized from BAL-AM-PS-resin loaded with amines (EMC Microcollections, Tübingen, Germany).

The peptides were purified by preparative reversed-phase HPLC. The following columns were used:

- Waters SunFire Prep C18 OBD Column, 5 µm, 30x100 mm, Part No. 186002572 (one column or two columns in series)
- Waters SunFire Prep C18 OBD Column, 5 µm, 30x150 mm, Part No. 186002797
- Waters Atlantis Prep OBD T3 Column, 5 µm, 30x150 mm, Part No.186003703
- Waters XBridge Prep C8 OBD Column, 5 µm, 30x150 mm, Part No. 186003083
- Machery-Nagel Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250x40 mm, Part No. 715340.400

Mobile phases consisted of eluent A (0.1% TFA in H_2O) and eluent B (ACN). Gradients were designed based on the specific requirements of the separation problem. Pure products were lyophilized from ACN/H_2O.

The products were analyzed by analytical HPLC using UV detection at λ=214 nm (Column: Bischoff UHC-640, 53x4.0 mm, ProntoSil 120-3-C18-H, 3 µm, Part No. 0604F185PS030) Mobile phases consisted of eluent A (0.07% TFA in H_2O) and eluent B (0.1% TFA in ACN). Additional characterization of the products was done by UPLC-MS (Column: Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm, Part No. 186002350) using electrospray ionization.

The peptides that are exemplified in Table 4 were synthesized using the general procedures described below. Unsubstituted N- or C-termini are indicated by small italic *H-* or *-OH*, respectively.

Table 4:

Example	Sequence	Type of Ring
Example 1	*p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-D-Phenethylamine	Lactam K^6-D^{12}
Example 2	*p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-E-Phenethylamine	Lactam K^6-E^{12}
Example 3	*p*E-R-P-R-L-Orn-H-F-G-P-Nle-D-Phenethylamine	Lactam O^6-D^{12}
Example 4	*p*E-R-P-R-L-Dab-H-F-G-P-Nle-D-Phenethylamine	Lactam Dab^6-D^{12}
Example 5	*p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-F	Lactam K^6-C-terminus
Example 6	*p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-f	Lactam K^6-C-terminus
Example 7	Q-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-G-G	Lactam N-terminus- C-terminus, Disulfide C^6-C^{12}
Example 8	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 9	*p*E-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 10	*p*E-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}

Example 11	*H*-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 12	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-Phenethylamine	Disulfide C^6-C^{12}
Example 13	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 14	*p*E-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 15	*p*E-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 16	*H*-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^5-C^{11}
Example 17	*H*-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 18	*H*-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 19	*p*E-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C-Phenethylamine	Disulfide C^6-C^{12}
Example 20	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-Aib-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 21	*p*E-R-P-R-L-C-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 22	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Palmitoyl)-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 23	*p*E-R-P-R-L-C-K(Palmitoyl)-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 24	Palmitoyl-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 25	Lauroyl-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 26	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroyl)-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 27	*p*E-R-P-R-L-C-K(Lauroyl)-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 28	*p*E-R-P-C-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfides C^6-C^{12}, C^4-C^7
Example 29	*p*E-R-C-R-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfides C^6-C^{12}, C^3-C^7
Example 30	*p*E-r-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 31	*p*E-F-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 32	*p*E-E-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 33	*p*E-R-p-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 34	*p*E-R-K-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 35	*p*E-R-D-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 36	*p*E-R-P-F-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 37	*p*E-R-P-R-K-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 38	*p*E-R-P-R-L-C-H-E-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 39	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-D-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 40	*p*E-R-P-E-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 41	*p*E-R-P-R-(4-PhF)-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}

Example 42	*p*E-R-P-R-D-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 43	*p*E-R-P-R-L-C-E-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 44	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-L-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 45	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-R-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 46	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-(Pipecolic acid)-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 47	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-(3-PyA)-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 48	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-H-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 49	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-E-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 50	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 51	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-*h*C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 52	*p*E-R-P-R-L-*h*C-H-K-G-P-Nle-*h*C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 53	*p*E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 54	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 55	*p*E-R-P-R-L-(D-*h*C)-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 56	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-c-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 57	*p*E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-c-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 58	Myristoyl-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 59	Myristoyl-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 60	Myristoyl-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 61	*p*E-R-P-R-L-C-H-K(Myristoyl)-G-P-Nle-C-F-*OH*	Disulfide C^6-C^{12}
Example 62	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-NH_2	Disulfide C^6-C^{12}
Example 63	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-NH_2	Disulfide C^6-C^{12}
Example 64	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	-S-CH_2-C(=O)CH_2-S-[C^6-C^{12}]
Example 65	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	Monosulfide C^6-C^{12}
Example 66	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	-S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-[C^6-C^{12}]

Analytical Methods

1) HPLC - Analytical Method A

- Column: Bischoff UHC-640 (53x4.0 mm) with ProntoSil 120-3-C18-H, 3 µm; Part n°: 0604F185PS030
- Eluent A: 0.07% TFA in water / Eluent B: 0.1% TFA in ACN
- Flow: 1.5 ml/min
- Temperature: 40 °C
- Gradient:

Time [min]	A [%]	B [%]
0.0	90	10
9.5	0	100
12.0	0	100
12.2	90	10

2a) UPLC-MS - Analytic Method B

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; Part n°: 186002350
- Eluent A: 0.1% FA in water; Eluent B: 0.1% FA in ACN
- Flow: 0.7 ml/min
- Temperature: 40 °C
- Gradient:

Time [min]	A [%]	B [%]
0 .0	80	20
1.0	75	25
4.2	10	90
4.3	0	100
4.6	80	20

2b) UPLC-MS - Analytic Method C

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; Part n°: 186002350
- Eluent A: 0.1% FA in water; Eluent B: 0.1% FA in ACN
- Flow: 0.7 ml/min
- Temperature: 40 °C
- Gradient:

Time [min]	A [%]	B [%]
0.0	99	1
1.0	97	3
3.5	50	50
4.0	10	90
4.3	0	100
4.6	80	20

The analytical data for peptides of Examples 1 to 63 are summarized in Table 5 and was generated using the analytical methods described supra.

Table 5

	HPLC		**Mass spectrometry**				
Peptide	**t_R [min]**	**Meth.**	**$[M+2H]^{2+}$** (measured)	**$[M+3H]^{3+}$** (measured)	**Meth.**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Example 1	4.16	A	766.3	511.2	C	766.4	511.3
Example 2	4.18	A	773.5	515.8	C	773.4	516.0
Example 3	4.14	A		506.6	C	759.4	506.6
Example 4	4.15	A	752.4	501.9	C	752.4	501.9
Example 5	3.70	A		484.5	C	726.4	484.6
Example 6	3.84	A		484.5	C	726.4	484.6
Example 7	3.85	A		553.6	C	829.9	553.6
Example 8	3.43	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6
Example	3.77	A		495.2	C	742.4	495.3

9							
Example 10	3.74	A	742.5	495.1	C	742.4	495.3
Example 11	3.61	A	742.9	495.2	C	742.4	495.3
Example 12	3.62	A		497.8	C	746.4	497.9
Example 13	3.49	A	768.3	512.5	C	768.4	512.6
Example 14	4.14	A	808.5	539.2	C	808.4	539.3
Example 15	3.99	A	773.4	515.8	C	773.4	515.9
Example 16	3.36	A		475.5	C	712.9	475.6
Example 17	3.28	A		527.5	C	790.9	527.6
Example 18	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
Example 19	4.38	A	756.0	504.2	C	755.9	504.3
Example 20	3.17	A	782.6	522.0	C	782.4	521.9
Example 21	3.45	A		512.0	C	767.4	511.9
Example 22	6.12	A		585.6	B	878.0	585.7
Example 23	6.46	A	883.2	588.9	B	883.0	589.0
Example 24	5.20	A		646.0	B	968.6	646.0
Example 25	5.18	A		627.3	B	940.5	627.3

Example 26	5.11	A		567.0	B	850.0	567.0
Example 27	5.44	A		570.0	B	855.0	570.3
Example 28	4.16	A	723.7		C	723.8	482.9
Example 29	3.85	A	753.0	502.5	C	753.3	502.6
Example 30	3.39	A		512.5	C	768.4	512.6
Example 31	4.08	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
Example 32	3.59	A	754.8	503.6	C	754.9	503.6
Example 33	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
Example 34	3.14	A		522.8	C	783.9	522.9
Example 35	3.36	A		518.5	C	777.4	518.6
Example 36	3.91	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
Example 37	3.05	A		517.5	C	775.9	517.6
Example 38	3.67	A	768.7	512.8	C	768.9	512.9
Example 39	3.47	A		531.7	C	797.4	531.9
Example 40	3.60	A	754.9	503.6	C	754.9	503.6
Example 41	3.91	A		549.1	C	823.4	549.3
Example	3.10	A	769.2	513.1	C	769.4	513.2

42							
Example 43	3.58	A	764.2	509.7	C	764.4	509.9
Example 44	3.82	A		531.1	C	796.4	531.3
Example 45	3.16	A		545.5	C	817.9	545.6
Example 46	3.54	A		517.1	C	775.4	517.3
Example 47	2.53	A		524.1	C	785.9	524.3
Example 48	2.49	A		509.2	C	763.4	509.3
Example 49	2.73	A	759.3	506.5	C	759.4	506.6
Example 50	2.72	A	694.5		C	694.8	463.6
Example 51	3.38	A		517.1	C	775.4	517.3
Example 52	3.45	A		521.9	C	782.4	521.9
Example 53	3.52	A	768.4	512.5	C	768.4	512.6
Example 54	3.43	A	775.3	517.1	C	775.4	517.3
Example 55	3.83	A	782.3	521.8	C	782.4	521.9
Example 56	3.42	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6
Example 57	3.66	A	768.3	512.4	C	768.4	512.6
Example 58	5.68	A		685.0	B	1027.1	685.0

Example 59	5.58	A		733.4	B	1099.6	733.4
Example 60	5.55	A		781.8	B	1172.1	781.8
Example 61	3.18	D	874.5	582.9	D	873.5	585.7
Example 62	3.22	A		512.3	C	767.9	512.3
Example 63	2.71	A	694.3	463.1	C	694.4	463.2

General Synthesis Procedures

1) Loading of first amino acid onto 2-chlorotrityl chloride resin and Fmoc-removal

2-Chlorotrityl chloride resin (1 eq., 1.0-1.6 mmol/g) was washed thoroughly with DCM. The desired amino acid (typically 0.5-2 eq. relative to the resin, considering 1.6 mmol/g loading) was dissolved in DCM (approx. 10 mL per gram of resin) and DIPEA (4 eq. relative to the resin, considering 1.6 mmol/g loading). The solution was added to the resin and the suspension was shaken at rt for 19 h. The resin was drained and then thoroughly washed sequentially with DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), DCM, DMA, DCM.

For Fmoc removal and determination of the loading the resin was shaken repeatedly with piperidine/DMA (1:4) or 4-methylpiperidine/DMA (1:4) (12 x 10 mL per gram of initial resin) and washed with DMA (2 x 10 mL per gram of initial resin). The combined solutions were diluted with MeOH to a volume ***V*** of 250 mL per gram of initial resin. A 2 mL aliquot (V_a) of this solution was diluted further to 250 mL (V_t) with MeOH. The UV absorption was measured at 299.8 nm against a reference of MeOH, giving absorption ***A***. The resin was thoroughly washed sequentially with DMA, DCM, DMA, DCM and dried in high vacuum at 40°C, affording ***m*** g of resin.

The loading of the resin is calculated according to the formula:

Loading [mol/g] = $(A \times V_t \times V)/(d \times \varepsilon \times V_a \times m)$

(with d: width of cuvette; $\varepsilon = 7800$ L mol^{-1} cm^{-1})

2) Solid phase peptide synthesis on Prelude™ synthesizer

2a) Synthesis Cycle A

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with 4-methylpiperidine/DMA (1:4). The resin was washed with DMA. Coupling was done by addition of the Fmoc-amino acid (3 eq.; 0.2 M solution in NMP), HCTU (3 eq.; 0.3 M solution in NMP), and DIPEA (3.3 eq.; 0.66 M solution in NMP) followed by mixing of the suspension with nitrogen at rt for typically 15 min to 4 h depending on the specific requirements. After washing with DMA the coupling step was typically repeated 1 to 3 times depending on the specific requirements. After washing with DMA capping was performed by addition of a mixture of Ac_2O/pyridine/DMA (1:1:8) and subsequent mixing of the suspension at rt. The resin was washed with DMA.

2b) Synthesis Cycle B

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with piperidine/DMA (1:4). The resin was washed with DMA. Coupling was done by addition of the Fmoc-amino acid (3 eq.; 0.3 M solution in NMP), HCTU (3 eq.; 0.3 M solution in NMP), and DIPEA (4.5 eq.; 0.9 M solution in NMP) followed by mixing of the suspension with nitrogen at rt for typically 15 min to 4 h depending on the specific requirements. After washing with DMA the coupling step was typically repeated 1 to 3 times depending on the specific requirements. After washing with DMA capping was performed by addition of a mixture of Ac_2O/pyridine/DMA (1:1:8) and subsequent mixing of the suspension at rt. The resin was washed with DMA.

2c) Synthesis Cycle C

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with piperidine/DMA (1:4). The resin was washed with DMA. Coupling was done by addition of the Fmoc-amino acid (3 eq.; 0.3 M solution in NMP), HCTU (3 eq.; 0.3 M solution in NMP), and DIPEA (6 eq.; 0.9 M solution in NMP) followed by mixing of the suspension with nitrogen at rt for typically 15 min to 4 h depending on the specific requirements. After washing with DMA the coupling step was typically repeated 1 to 3 times depending on the specific requirements. After washing with DMA capping was performed by addition of a mixture of

Ac_2O/pyridine/DMA (1:1:8) and subsequent mixing of the suspension at rt. The resin was washed with DMA.

2d) Synthesis Cycle D

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with 4-methylpiperidine/DMA (1:4). The resin was washed with DMA. Coupling was done by addition of a mixture of the Fmoc-amino acid and Oxyma Pure (3 eq. each; 0.2 M of both in NMP) and DIC (3eq.; 0.3 M solution in NMP) followed by mixing of the suspension with nitrogen at rt for typically 15 min to 4 h depending on the specific requirements. After washing with DMA the coupling step was typically repeated 1 to 3 times depending on the specific requirements. After washing with DMA capping was performed by addition of a mixture of Ac_2O/pyridine/DMA (1:1:8) and subsequent mixing of the suspension at rt. The resin was washed with DMA.

3) Cleavage from resin with or without concomitant removal of protecting groups

3a) Cleavage Method A

The resin (0.1 mmol) was shaken at rt for 2 h with 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL). The cleavage solution was filtered off, and fresh solution was added (3 mL). The suspension was shaken at rt for 1 h then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution was added (3 mL) and the suspension was shaken at rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off. The combined cleavage solutions were poured slowly onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The solid was dried in high vacuum.

3b) Cleavage Method B

The resin (0.1 mmol) was treated with 95% aq. TFA/EDT (4:1) (0.75 mL) and the suspension was shaken at rt for 1 h. A mixture of 95% aq. TFA (2.18 mL) and TIS (75 μL) was added and shaking at rt was resumed for 1 h. The cleavage solution was filtered off then 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL) was added to the resin and the suspension was shaken at

rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off and collected and fresh solution was added (3 mL). The suspension was shaken at rt for 1 h then the cleavage solution was filtered off. The combined cleavage solutions were poured onto cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL). The precipitate thus formed was left to settle, centrifuged then the supernatant was carefully poured off. The precipitate was washed once with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off.. The residue was dried in high vacuum.

3c) Cleavage Method C

HFIP/DCM (30:70) (5 mL) was added to the resin (0.1 mmol) and the suspension was stirred at rt for 1.5 h. The cleavage solution was filtered off and collected and fresh HFIP/DCM (30:70) (5 mL) was added. The suspension was stirred at rt for 30 min. The cleavage solution was filtered off and collected. The resin was washed with DCM (2 x 5 mL) which was also collected. The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in high vacuum. The residue was lyophilized from tBuOH/H_2O (1:1).

4) Cyclization Methods

4a) Cyclization Method A *(Disulfide Formation)*

The fully deprotected linear precursor peptide was dissolved in H_2O/DMSO (9:1) or (4:1) to give typically a concentration of 1-15 mg/mL. The reaction mixture was then stirred at rt for typically 40 h depending on the requirements and then concentrated to dryness in high vacuum.

4b) Cyclization Method B *(Disulfide Formation)*

The fully deprotected linear precursor peptide (1 eq.) was dissolved in H_2O to give typically a concentration of 10 mg/mL. A solution of 50 mM I_2 in AcOH (1.2 eq.) was added in one portion to the stirred solution and the reaction was stirred for 10 min at rt. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O (1.5 eq) was added to quench the excess of I_2. The solution was concentrated to near dryness in vacuo.

4c) Cyclization Method C *(Selective Formation of Two Disulfides)*

The partially protected linear precursor peptide (1 eq.) (two cysteines were protected with Acm and two cysteines unprotected) was dissolved in AcOH/H_2O (4:1) to give typically a concentration of 1 mg/mL. 50 mM I_2 in AcOH (2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Further 50 mM I_2 in AcOH (10 eq.) was added portionwise over 4 h. After 21 h, the reaction mixture was concentrated to near dryness in vacuoand 1 M ascorbic acid in H_2O was added in excess to quench unreactedI_2.

4d) Cyclization Method D (*Lactam Formation Between Side Chains*)

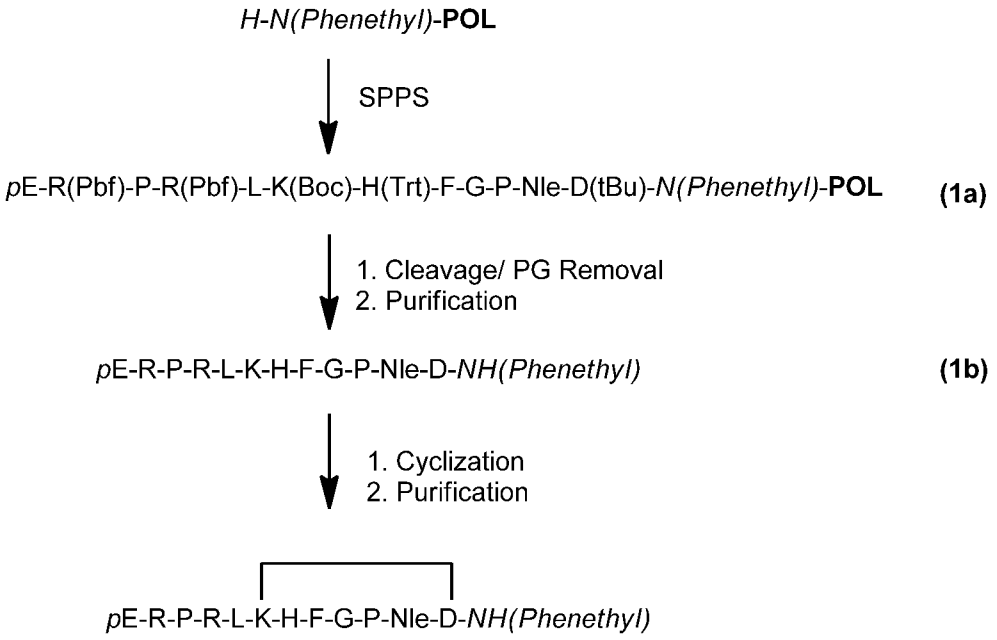
The fully deprotected linear precursor peptide (1 eq.) and HATU (1.5 eq.) were dissolved in NMP (peptide concentration: typically1 mmol/L). DIPEA (3 eq.) was added and the solution stirred at rt for 90 min. The reaction mixture was concentrated to dryness in vacuo.

4e) Cyclization Method E (*Lactam Formation Between Side Chain and C-Terminus*)

A solution of the peptide (1 eq.), HATU (1.3 eq.) and HOAt (1.3 eq.) in DMF (peptide concentration: 2.6 mmol/L) was treated with 2,6-lutidine (20 eq.) and the reaction was stirred at rt for 2 h. The reaction mixture was concentrated to dryness in vacuo.

In the following the syntheses of representative examples are described.

Example 1 Synthesis of *p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-D-Phenethylamine (lactam K^6-D^{12})



Example 1

- Preparation of **Intermediate 1a**

  (Assembly of linear peptide)

Phenethylamine-BAL-PS resin (167 mg, 0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
1	D(tBu)	2 x 4 h	C
2	Nle	1 x 3 h	C
3	P	2 x 45 min	C
4	G	2 x 90 min	C
5	F	1 x 3 h	C
6	H(Trt)	2 x 45 min	C
7	K(Boc)	2 x 4 h	C
8	L	4 x 1 h	C
9	R(Pbf)	4 x 1 h	C
10	P	2 x 90 min	C

11	R(Pbf)	4 x 1 h	C
12	*p*E	2 x 90 min	C

- Preparation of **Intermediate 1b**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal then purification)

A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (2 mL) was added to **Intermediate 1a** (0.1 mmol) and the suspension was shaken at rt for 2.5 h. The cleavage solution was filtered off, and fresh cleavage solution (2 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 45 min then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution (2 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 45 min. The cleavage solution was filtered off and the resin was washed with 95% aq. TFA (1 mL). The combined cleavage solutions were poured onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (20 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The solid was dried in high vacuum. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 1b** as a white solid in two batches of different qualities: Batch A (35.9 mg (98% purity), 0.018 mmol) and batch B (52.9 mg (80% purity), 0.021 mmol).

- Preparation of **Example 1**
  (*Cyclization and purification)*

Both batches from the previous step were treated separately following the same protocol:

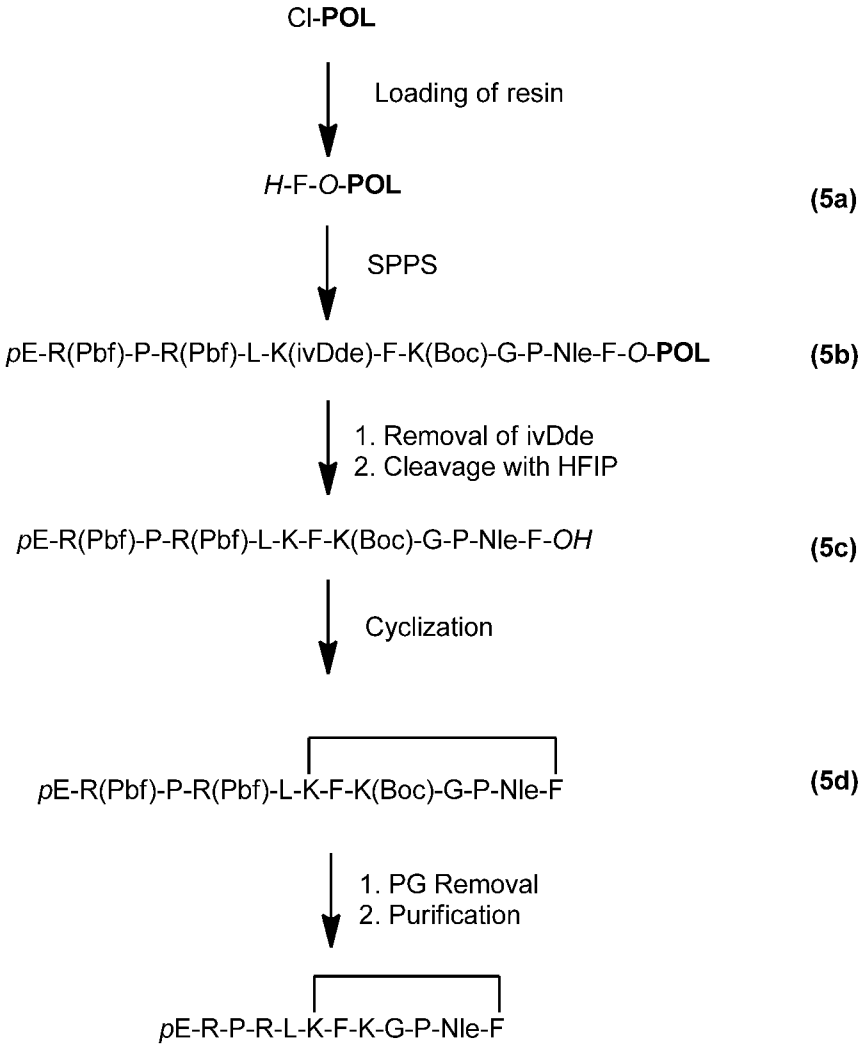
Batch A: A solution of the peptide (35.9 mg (98% purity), 0.018 mmol) and HATU (10.0 mg, 0.026 mmol) in NMP (18 mL) and DIPEA (9.2 µL, 0.053 mmol) was stirred at rt for 2 h.

Batch B: A solution of the peptide (52.9 mg (80% purity), 0.021 mmol) and HATU (14.5 mg, 0.038 mmol) in NMP (26 mL) and DIPEA (13.0 µL, 0.076 mmol) was stirred at rt for 2 h.

Each of the batches was concentrated to dryness in vacuo. The product was isolated by preparative HPLC. Pure fractions of both purifications were combined and lyophilized from ACN/H_2O to give **Example 1** as a white solid (52.0 mg, 0.025 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A: t_R=4.16 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=511.2; calculated: $[M+3]^{3+}$=511.3).

Example 5 Synthesis *p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-F (Lactam K^6-C-terminus)



Example 5

- Preparation of **Intermediate 5a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-F-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (10.0 g, 16.0 mmol) was reacted with a solution of Fmoc-F-OH (6.24 g, 32.0 mmol) in DCM (100 mL) and DIPEA (11.2 mL, 64.0 mmol) in analogy to the general procedure described above to give **Intermediate 5a** (12.8 g, loading = 0.79 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 5b**

  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 5a (0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
2	Nle	2 x 90 min	B
3	P	2 x 30 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(ivDde)	2 x 30 min	B
6	F	2 x 30 min	B
7	K(Boc)	4 x 1 h	B
8	L	2 x 30 min	B
9	R(Pbf)	4 x 1 h	B
10	P	2 x 90 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	*p*E	2 x 90 min	B

- Preparation of **Intermediate 5c**

  (Removal of ivDde and cleavage from the resin)

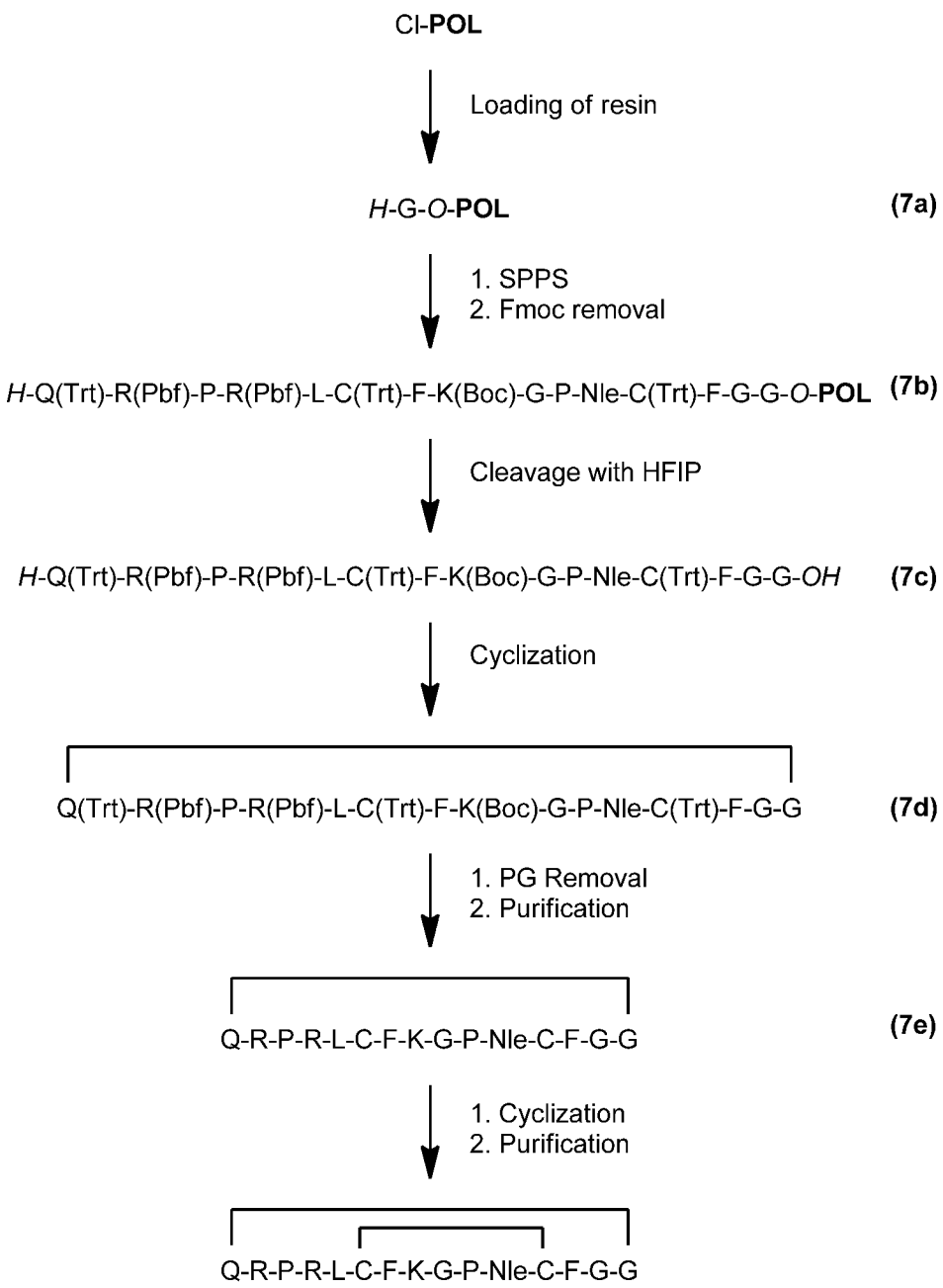
Intermediate 5b (0.100 mmol) was treated six times for 10 min with a solution of hydrazine monohydrate (0.081 mL, 1.67 mmol) in DMA (4 mL). Then the resin was treated three times for 20 min with a solution of hydrazine monohydrate (0.081 mL, 1.67 mmol) in THF (4 mL). The resin was washed with DCM (3x). HFIP/DCM (30:70) (5 mL) was added to the resin (0.100 mmol) and the suspension was stirred at rt for 1.5 h. The cleavage solution was filtered off and fresh HFIP/DCM (30:70) (5 mL) was added. The suspension was stirred at rt for 30 min. The cleavage solution was filtered off. The resin was washed with DCM (2 x 5 mL). The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in vacuo. The residue was lyophilized from tBuOH/H_2O (1:1) to give **Intermediate 5c** (187 mg, 0.090 mmol).

- Preparation of **Example 5**
  (Cyclization and removal of protecting groups)

A solution of **Intermediate 5c** (187 mg, 0.090 mmol), HATU (44.6 mg, 0.117 mmol) and HOAt (16.0 mg, 0.117 mmol) in DMF (35 mL) was treated with 2,6-lutidine (0.210 mL, 1.80 mmol) and the reaction was stirred at rt for 2 h. The reaction mixture was concentrated to dryness in vacuo. The residue was dissolved in 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (5 mL) and the solution was stirred at rt for 2.5 h. The cleavage solution was poured onto cold heptane/diethyl ether (1:1) (30 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The washing step was repeated once. The residue was dried in high vacuum. The product was isolated by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 5** as a white solid (41.4 mg, 0.023 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A: t_R=3.70 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=484.5; calculated: $[M+3]^{3+}$=484.6).

Example 7 Synthesis Q-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-G-G (Lactam N-terminus-C-terminus)



Example 7

- Preparation of **Intermediate 7a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with with Fmoc-Gly-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (2.00 g, 3.20 mmol) was reacted with a solution of Fmoc-Gly-OH (0.476 g, 1.60 mmol) in DCM (20 mL) and DIPEA (2.24 mL, 12.8 mmol) in analogy to the

general procedure described above to give **Intermediate7a** (2.22 g; loading = 0.68 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 7b**
  (Assembly of linear peptide and Fmoc removal)

Intermediate 7a (147 mg, 0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
1	G	2 x 30 min	B
2	F	2 x 30 min	B
3	C(Trt)	2 x 30 min	B
4	Nle	2 x 90 min	B
5	P	2 x 30 min	B
6	G	2 x 90 min	B
7	K(Boc)	2 x 30 min	B
8	F	2 x 30 min	B
9	C(Trt)	2 x 30 min	B
10	L	2 x 30 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	P	2 x 90 min	B
13	R(Pbf)	4 x 1 h	B
14	Q(Trt)	2 x 90 min	B

After assembly of the peptide Fmoc was removed by repetitive treatment with piperidine/DMA (1:4). The resin was washed with DMA to afford **Intermediate 7b** (0.100 mmol).

- Preparation of **Intermediate 7c**
  (HFIP cleavage from the resin)

HFIP/DCM (30:70) (3 mL) was added to **Intermediate 7b** (0.100 mmol) and the suspension was shaken at rt for 1.5 h. The cleavage solution was filtered off and fresh HFIP/DCM

(30:70) (3 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 30 min. The cleavage solution was filtered off. The resin was washed with DCM (2 x 3 mL). The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in vacuo. The residue was lyophilized from tBuOH/H_2O (1:1) to give **Intermediate 7c** (203 mg, 0.067 mmol).

- Preparation of **Intermediate 7d**
  (Backbone cyclization)

A solution of **Intermediate 7c** (203 mg, 0.067 mmol), HATU (33.3 mg, 0.088 mmol) and HOAt (11.9 mg, 0.088 mmol) in DMF (40 mL) was treated with 2,6-lutidine (0.157 ml, 1.35 mmol) and the reaction was stirred at rt for 2 h. The reaction mixture was concentrated to dryness in vacuo to afford **Intermediate 7d** (0.067 mmol).

- Preparation of **Intermediate 7e**
  (Removal of protecting groups then purification)

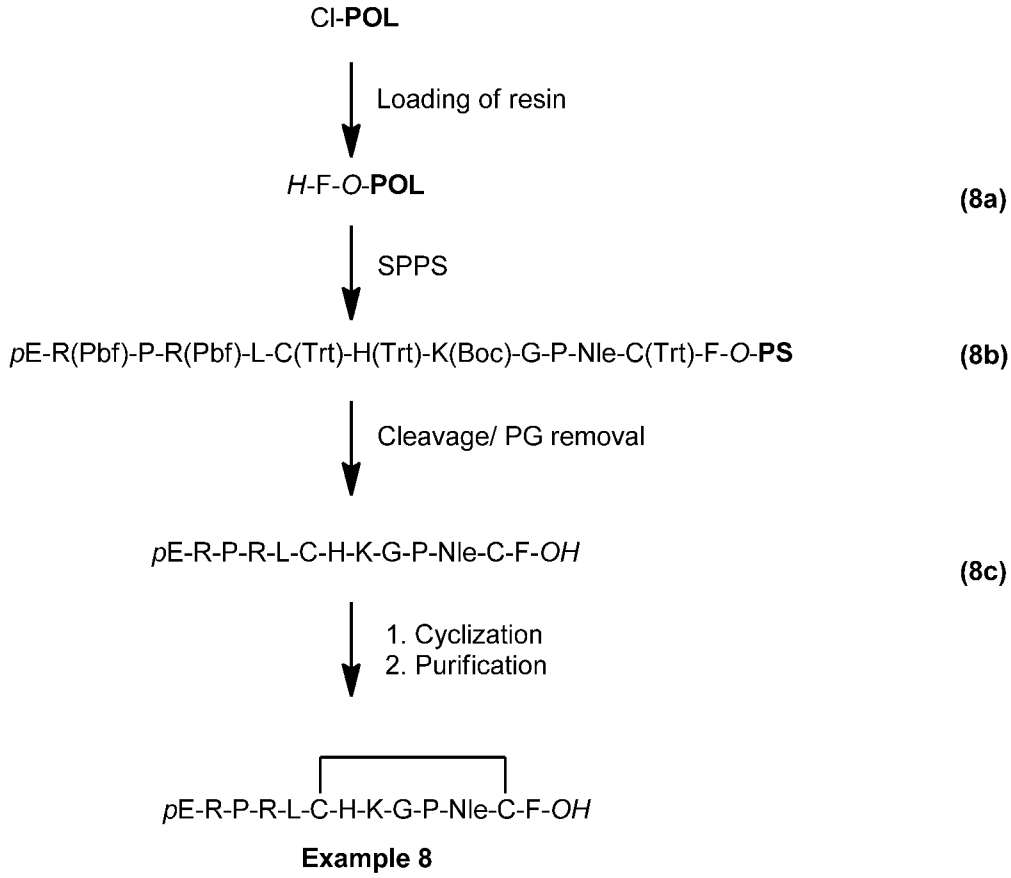
A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL) was added to **Intermediate 7d** (0.067 mmol) and the suspension was shaken at rt for 2.5 h. The solution was poured onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (30 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The washing step was repeated once. The solid was dried in high vacuum. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 7e** as a white solid (33.6 mg, 0.017 mmol).

- Preparation of **Example 7**
  (Cyclization and purification)

Intermediate 7e (33.6 mg, 0.017 mmol) was dissolved in H_2O/DMSO (9:1) (30 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 40 h then concentrated to dryness in vacuo. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 7** as a white solid (21.0 mg; 0.010 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A: t_R=3.85 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=553.6; calculated: $[M+3]^{3+}$=553.6).

Example 8 Synthesis of *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH* (disulfide C^6-C^{12})



- Preparation of **Intermediate 8a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-F-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (40.0 g, 64.0 mmol) was washed with DCM (3x). A solution of Fmoc-F-OH (24.8 g, 64.0 mmol) in DCM (400 mL) and DIPEA (44.7 mL, 256 mmol) was added and the suspension was shaken for 22 h at rt. The resin was washed thoroughly with DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x).

The resin was then treated four times for 10 min with a mixture of piperidine/DMA (1:4) (400 mL) followed by washing with DMA (2 x 180 ml). The piperidine/DMA solutions and DMA washing solutions were collected for determination of the loading of the resin. 1 mL of the

combined solutions was diluted to 500 mL with MeOH and the UV absorption at 299.8 nm was measured to be A = 0.368. This corresponds to an Fmoc amount of 46.2 mmol.

The resin was washed thoroughly with DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) and dried in vacuo to give **Intermediate 8a** (50.7 g; loading = 0.91 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 8b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 8a (2.64 g, 2.40 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
1	C(Trt)	2 x 30 min	D
2	Nle	2 x 15 min	A
3	P	2 x 15 min	A
4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2 x 15 min	A
6	H(Trt)	2 x 15 min	A
7	C(Trt)	2 x 60 min	D
8	L	2 x 15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2 x 15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	*p*E	2 x 15 min	A

- Preparation of **Intermediate 8c**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal)

Intermediate 8b (2.40 mmol) was carefully washed with DCM (4x). A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (50 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off, and fresh cleavage solution (35 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 1 h then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution (35 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off. The combined cleavage solutions were poured slowly onto a stirred mixture of

cold heptane/diethyl ether (1:1) (500 mL), giving a precipitate. The suspension was stirred at rt for 2 h and then the precipitate was allowed to settle down. The supernatant was sucked off with a frit. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (2 x 100 mL), the supernatant was sucked off with a frit. The solid was dried in high vacuum to afford **Intermediate 8c** as an off-white solid (3.75 g, 1.88 mmol).

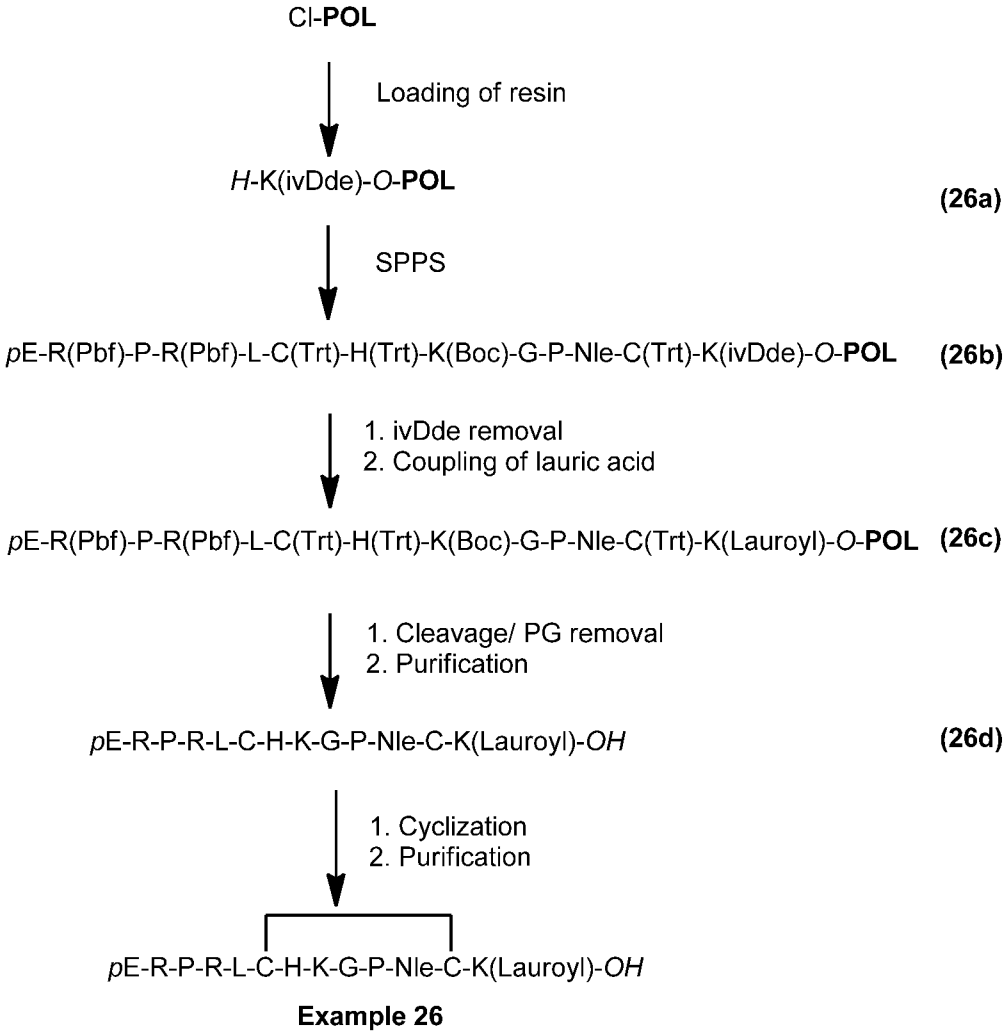
- Preparation of **Example 8**
  (Cyclization and Purification)

Intermediate 8c (3.75 g, 1.88 mmol) was dissolved in H_2O (375 mL). A solution of 50 mM I_2 in AcOH (45.1 mL, 2.26 mmol) was added in one portion to the stirred solution and the solution was stirred for 10 min at rt. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O (5.64 mL, 2.82 mmol) was added to quench the excess of I_2. The solution was concentrated to near dryness. The reaction was performed in two portions: 0.188 mmol scale and 1.69 mmol scale. The crudes were combined for purification. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 8** as a white solid (1.53 g, 0.767 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method C: t_R=3.43 min) and UPLC-MS (Analytical method B; measured: $[M+3]^{3+}$=512.4; calculated: $[M+3]^{3+}$=512.6).

Alternatively, The crude polypeptide of Example 8 was dissolved in water (500mL of water/mmol of polypeptide) and was converted into the acetate salt with the aid of an ion exchange resin (i.e. Amberlite IRA-67 (Acetate-Form)(200g/mmol of polypeptide) and purified by preparative HPLC (C8 modified reversed phase silica gel from Daisogel, gradient: ACN/ H_2O: 3% ACN and 97% [mixture 0.3%Acetic acid/water] up to 12% ACN and 88% [mixture 0.3%Acetic acid/water]) and lyophilized to afford an acetate salt of Example 8 as a white solid (60-100% yield).
The salt stoichiometry was evaluated based on the analysis of the acetic acid content (ion chromatography) and water content and was determined to range between 1:3 and 1:4 (polypeptide: acetate).

Example 26 Synthesis of *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroyl)-*OH* (disulfide C^6-C^{12})



Example 26

- Preparation of **Intermediate 26a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with with Fmoc-K(ivDde)-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (1.00 g, 1.60 mmol) was reacted with a solution of Fmoc-K(ivDde)-OH (1.84 g, 3.20 mmol) in DCM (10 mL) and DIPEA (1.12 mL, 6.40 mmol) in analogy to the general procedure described above to give **Intermediate 26a** (1.39 g; loading = 0.75 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 26b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 26a (134 mg, 0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
1	C(Trt)	2 x 30 min	B
2	Nle	2 x 30 min	B
3	P	2 x 30 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(Boc)	2 x 30 min	B
6	H(Trt)	2 x 30 min	B
7	C(Trt)	2 x 30 min	B
8	L	2 x 30 min	B
9	R(Pbf)	4 x 1 h	B
10	P	2 x 90 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	*p*E	2 x 90 min	B

- Preparation of **Intermediate 26c**
  (Removal of ivDde and coupling of lauric acid)

Intermediate 26b (0.100 mmol) was washed with THF (3x). A solution of hydrazine monohydrate (0.245 ml, 5.00 mmol) in THF (12 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 1 h. The solution was filtered off. This step was done twice more. The resin was washed with DMA (3x), DCM (3x), DMA (2x), DCM (5x) and DMA (3x). Lauric acid (100 mg, 0.500 mmol) and HCTU (207 mg, 0.500 mmol) were dissolved in NMP (3 mL) and DIPEA (0.087 ml, 0.500 mmol). After 5 min activation the solution was added to the resin and the suspension was shaken at rt for 16 h. The reaction mixture was filtered off and the resin washed with DMA (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (5x) to afford **Intermediate 26c**.

- Preparation of **Intermediate 26d**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal then purification)

A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL) was added to **Intermediate 26c** (0.100 mmol) and the suspension was shaken at rt for 2 h. The cleavage solution was filtered

off, and fresh cleavage solution (3 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 1 h then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution (3 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off. The combined cleavage solutions were poured onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The solid was dried in high vacuum.

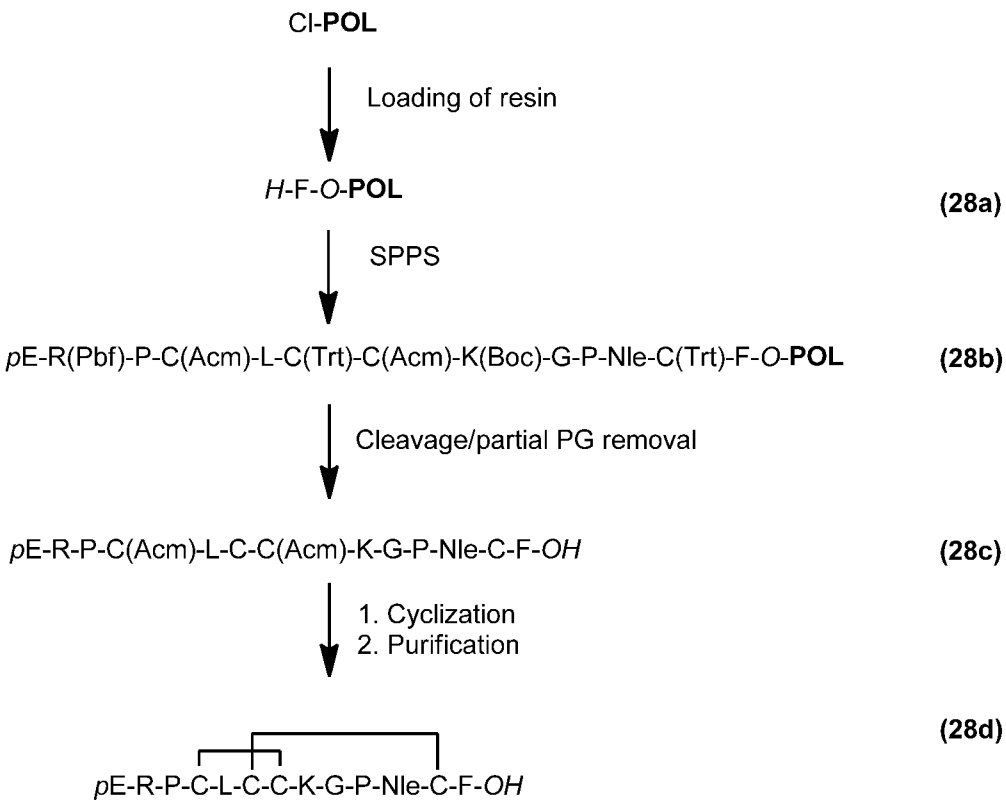
The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 26d** as a white solid (74.1 mg, 0.034 mmol).

- Preparation of **Example 26**
  (Cyclization and Purification)

Intermediate 2d (74.1 mg, 0.034 mmol) was dissolved in H_2O/DMSO (9:1) (74 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 40 h then concentrated to dryness in vacuo. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 26** as a white solid (60.0 mg; 0.028 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A: t_R=5.11 min) and UPLC-MS (Analytical method B; measured: $[M+3]^{3+}$=567.0; calculated: $[M+3]^{3+}$=567.0).

Example 28 Synthesis *p*E-R-P-C-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH* (disulfides C^4-C^7 and C^6-C^{12})



Example 28

- Preparation of **Intermediate 28a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-F-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (10.0 g, 16.0 mmol) was reacted with a solution of Fmoc-F-OH (6.20 g, 16.0 mmol) in DCM (100 mL) and DIPEA (11.2 mL, 64.0 mmol) in analogy to the general procedure described above to give **Intermediate 28a** (11.6 g, loading = 0.87 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 28b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 28a (115 mg, 0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle

1	C(Trt)	2 x 15 min	B
2	Nle	2 x 15 min	B
3	P	2 x 15 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(Boc)	2 x 15 min	B
6	C(Acm)	2 x 15 min	B
7	C(Trt)	2 x 15 min	B
8	L	2 x 15 min	B
9	C(Acm)	2 x 15 min	B
10	P	2 x 15 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	*p*E	2 x 15 min	B

- Preparation of **Intermediate 28c**

  (Cleavage from the resin with concomitant partial protecting group removal)

Intermediate 28b (0.100 mmol))was carefully washed with DCM (4x). A mixture of 95% aq. TFA/EDT (4:1) (0.750 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 1 h. A mixture of TFA/H_2O (95:5) (2.18 mL) and TIS (75 μL) was added to the suspension and shaking at rt was continued for 1 h. The cleavage solution was filtered off and a mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL) was added to the resin. The suspension was shaken at rt for 1 h the cleavage solution was filtered off. Fresh solution was added (3 mL) and the suspension was shaken at rt for 1 h. The cleavage solution was filtered off. The combined cleavage solutions were poured onto cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The washing step was repeated once. The residue was dried in high vacuum. The crude product was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 28c** as a white solid (51.1 mg, 0.028 mmol).

- Preparation of **Example 28**

  (One-pot formation of two disulfides)

Intermediate 28c (51.1 mg, 0.028 mmol) was dissolved in AcOH (48 mL) and H_2O (12 mL).

A 50 mM solution of I_2 in AcOH (1.12 mL, 56 μmol) was added and the yellow solution was stirred at rt. Further 50 mM I_2 in AcOH (5.61 mL, 0.281 mmol) was added portion wise over 4 h. After 21 h, the reaction mixture was concentrated to 2 mL in vacuo and 1 M ascorbic acid in H_2O (6 mL) was added to quench the excess of I_2. The product was isolated by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 28** as a white solid (19.3 mg, 0.012 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A: t_R=4.16 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+2]^{2+}$=723.7; calculated: $[M+2]^{2+}$=723.8).

Example 62 Synthesis of *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*NH2* (disulfide C^6-C^{12})

Fmoc-NH-**POL**

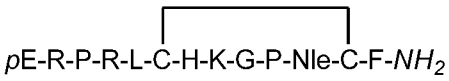
↓ SPPS

*p*E-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-Nle-C(Trt)-F-*NH*-**POL** **(62a)**

↓ Cleavage/ PG removal

*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-NH_2 **(62b)**

↓ 1. Cyclization
2. Purification



Example 62

- Preparation of **Intermediate 62a**
  (Assembly of linear peptide)

Fmoc protected Rink-Amide-AM-PS-resin (217 mg, 0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Prelude™ peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Synthesis cycle
1	F	2 X 15 min	A
2	C(Trt)	2 X 30 min	D
3	Nle	2 X 15 min	A
4	P	2 X 15 min	A
5	G	2 x 30 min	A
6	K(Boc)	2 X 15 min	A
7	H(Trt)	2 X 15 min	A
8	C(Trt)	2 x 1 h	D
9	L	2 X 15 min	A
10	R(Pbf)	4 x 1 h	A
11	P	2 X 15 min	A
12	R(Pbf)	4 x 1 h	A
13	*p*E	2 X 15 min	A

- Preparation of **Intermediate 62b**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal)

A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (3 mL) was added to **Intermediate 62a** (0.1 mmol) and the suspension was shaken at rt for 1.5 h. The cleavage solution was filtered off, and fresh cleavage solution (2 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 45 min then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution (2 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 45 min. The combined cleavage solutions were poured onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (35 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. The residue was washed with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. The solid was dried in high vacuum. The crude product **Intermediate 62b** was used in the next step without purification.

- Preparation of **Example 62**
  (Cyclization and Purification)

Intermediate 62b (0.100 mmol) was dissolved in H_2O (20 mL). A solution of 50 mM I_2 in AcOH (2.4 mL, 0.120 mmol) was added in one portion to the stirred solution and the solution

was stirred for 30 min at rt. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O (0.30 mL, 0.300 mmol) was added to quench the excess of I_2. The solution was concentrated to near dryness. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Example 62** as a white solid (50.5 mg, 0.025 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method C: t_R=3.22 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=512.3; calculated: $[M+3]^{3+}$=512.3).

The other examples were synthesized in analogy:

- **Examples 2** to **4** were synthesized in analogy to **Example 1**.
- **Example 6** was synthesized in analogy to **Example 5**.
- **Example 9** to **25, and 27** were synthesized in analogy to **Example 26**.
- **Example 29** was synthesized in analogy to **Example 28**.
- **Examples 30** to **61** were synthesized in analogy to **Example 8**.
- **Example 63** was synthesized in analogy to **Example 62**.

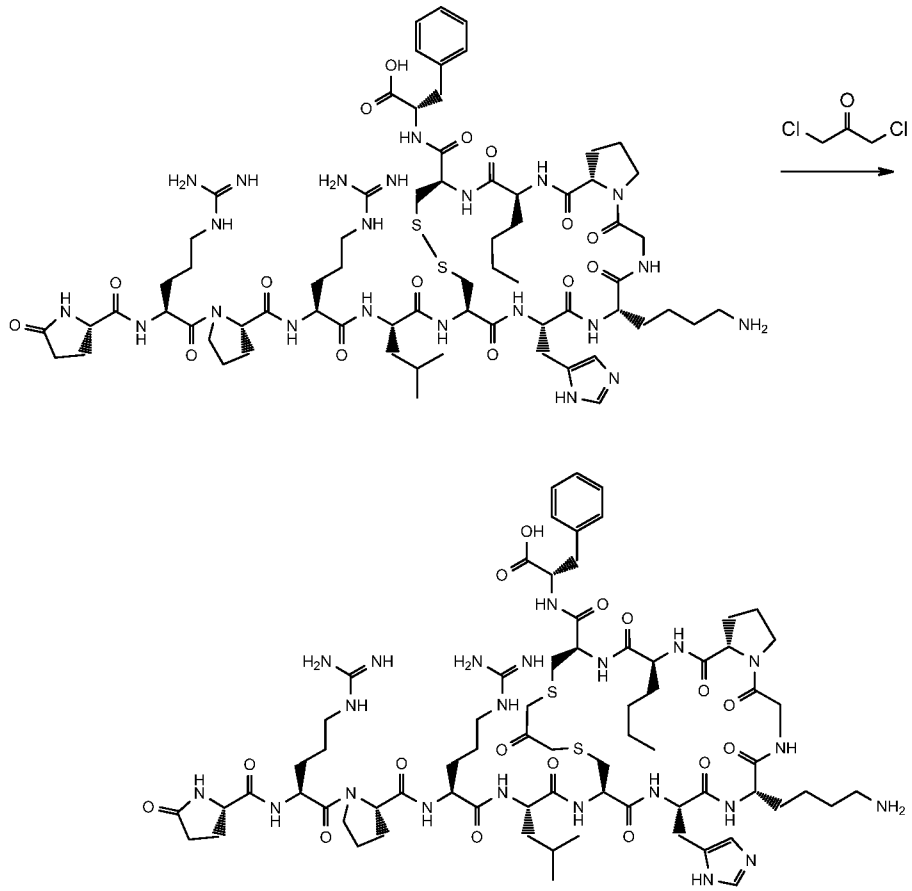
Example 64: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH with a* -S-CH_2-C(O)CH_2-S- linkage between the cysteines at position 6 and 12 [C^6-C^{12}]

Analytical method

Method D (HRMS) ;

Eluent A : water + 0.05% Formic acid +3.75 mM ammonium acetate, Eluent B : Acetonitrile + 0.04% Formic acid.

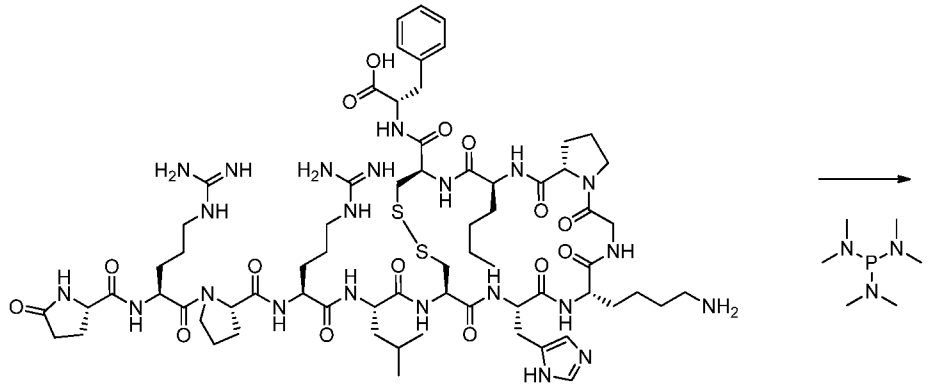
Gradient : from 2 to 98% B in 4.4 min – Flow 1.0 ml/min. Column : Acquity CSH 1.7µm 2.1*50mm 50°C

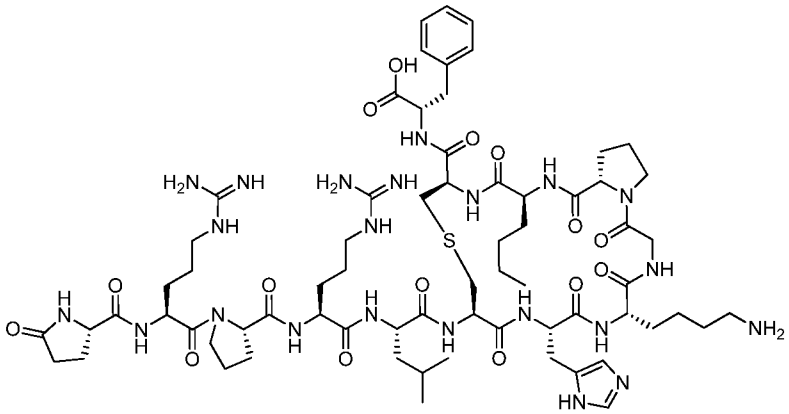


Example 8 ((S)-2-((3S,6R,11R,14S,17S,25aS)-14-((1H-imidazol-5-yl)methyl)-17-(4-aminobutyl)-3-butyl-11-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)pentanamido)-4-methylpentanamido)-1,4,12,15,18,21-hexaoxodocosahydro-1H-pyrrolo[2,1-j][1,2,5,8,11,14,17,20]dithiahexaazacyclotricosine-6-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid) (12 mg, 6.76 µmol) was dissolved in 50mM sodium phosphate buffer pH6.5 (1.5 ml), into which was added TCEP HCl ((*tris*(2-carboxyethyl)phosphine) (2.91 mg, 10.13 µmol) at RT. This reaction mixture was stirred for 1h at RT. Into above solution was added 1,3-dichloropropan-2-one (4.29 mg, 0.034 mmol) at RT, which was stirred for 30min at RT. RP-HPLC eluting 15-60% MeCN/water with 0.1%TFA gave Example 64 ((S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-yl)methyl)-20-(4-aminobutyl)-3-butyl-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)pentanamido)-4-methylpentanamido)-1,4,10,15,18,21,24-heptaoxohexacosahydropyrrolo[2,1 i][1,23,4,7,10,13,16,19]dithiahexaazacyclohexacosine-6-carboxamido)-3-phenylpropanoic

acid) (6 mg, 2.93 µmol, 43.4 % yield). HRMS (method D) [M+1]; 1590.7911 (observed), 1590.7912 (expected). Retension time ; 3.08min.

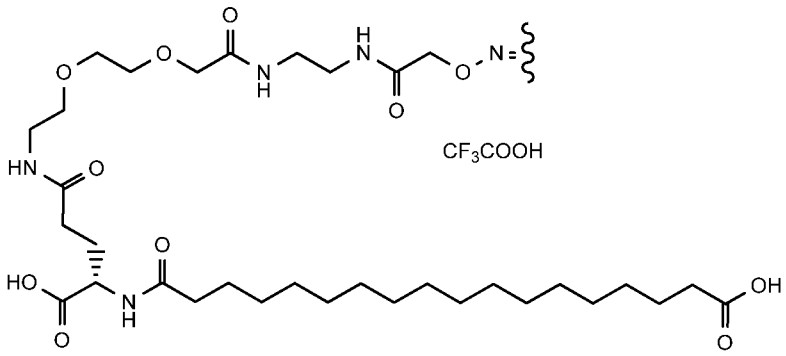
Example 65: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* with a monosulfide linkage between the 2 cysteines at position 6 and 12 [C^6-C^{12}]





The mixture of Example 8 (S)-2-((3S,6R,11R,14S,17S,25aS)-14-((1H-imidazol-5-yl)methyl)-17-(4-aminobutyl)-3-butyl-11-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido) pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)pentanamido)-4-methylpentanamido)-1,4,12,15,18,21-hexaoxodocosahydro-1H-pyrrolo[2,1-j][1,2,5,8,11,14,17,20]dithiahexaazacyclotricosine-6-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid TFA salts (30 mg, 0.15 mmol) and N,N,N',N',N'',N''-hexamethylphosphinetriamine (12.3 mg, 0.75 mmol) in PBS pH 9.2 bufffer (1 mL) was stirred at RT for 3 days. The reaction mixture was purified by preparative HPLC (Sunfire C18, 0.1%TFA in water/MeCN) twice, and the product fraction was lyophilized to a white powder (Example 65: 4 mg, 13.4%). [M+2H]2+ (calc.)=752.88, [M+2H]2+ (measured)=752.40, [M+3H]3+ (calc.)=502.26, [M+3H]3+ (measured)=501.94. HPLC (analytical method C), Tr min=6.93.

Example 66: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* with a –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S- linkage between the 2 cysteines at position 6 and 12 [C^6-C^{12}] and Z is:

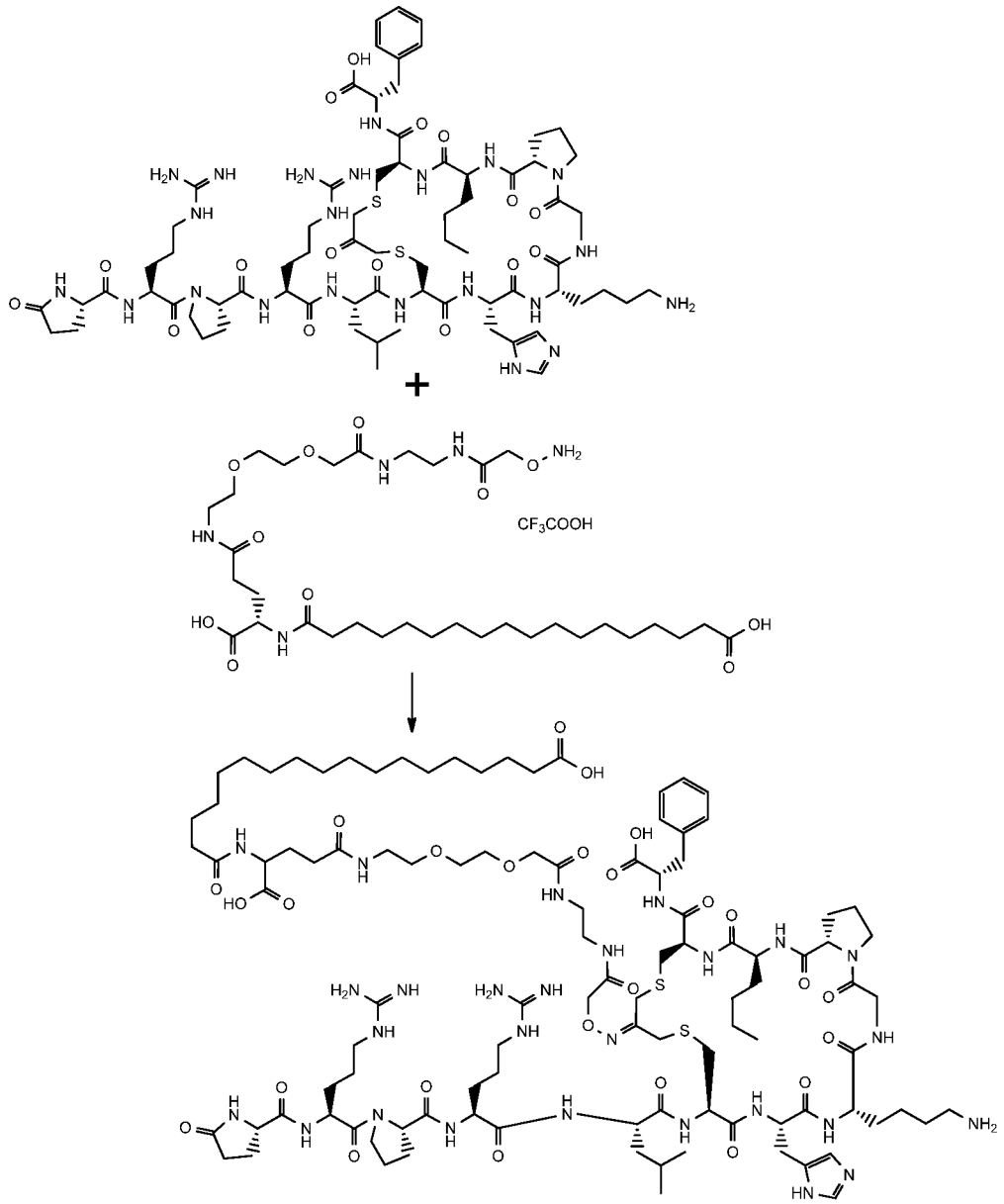


Analytical method

Method D (HRMS);

Eluent A : water + 0.05% Formic acid +3.75 mM ammonium acetate, Eluent B : Acetonitrile + 0.04% Formic acid.

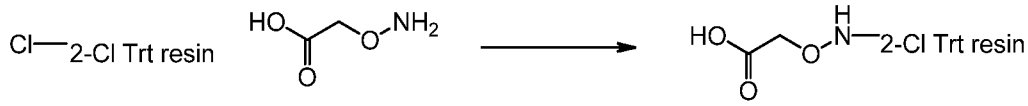
Gradient : from 2 to 98% B in 4.4 min – Flow 1.0 ml/min. Column : Acquity CSH 1.7µm 2.1*50mm 50°C



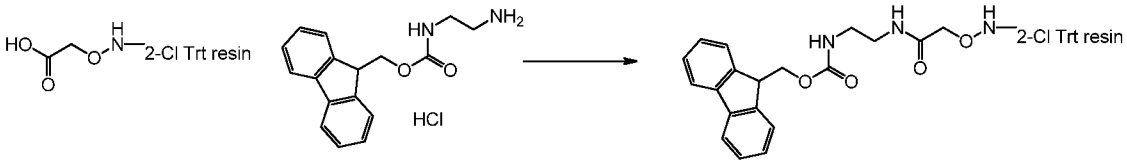
Into a solution of Example 64 ((S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-yl)methyl)-20-(4-aminobutyl)-3-butyl-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)pentanamido)-4-methylpentanamido)-1,4,10,15,18,21,24-heptaoxohexacosahydropyrrolo[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]dithiahexaazacyclohexacosine-6-carboxamido)-3-phenylpropanoic acid) (11.5 mg, 5.62 µmol) and (S)-1-(aminooxy)-19-carboxy-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaoctatriacontan-38-oic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) (9.19 mg, 0.011 mmol) in 100nM Na phosphate buffer pH6.0 (1ml) was added aniline (2.051 µl, 0.022 mmol) at RT. Addition of DMSO (50 µl) gave homogeneous solution. This reaction mixture was stirred at RT for 2h. RP-HPLC eluting 15-60% MeCN/water with 0.1% TFA gave

Example 66 (1-((Z)-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-yl)methyl)-20-(4-aminobutyl)-3-butyl-6-((S)-1-carboxy-2-phenylethylcarbamoyl)-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)pentanoyl)pyrrolidine-2-carboxamido)pentanamido)-4-methylpentanamido)-1,4,15,18,21,24-hexaoxodocosahydropyrrolo[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]dithiahexaazacyclohexacosin-10(1H,9H,11H)-ylidene)aminooxy)-19-carboxy-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaoctatriacontan-38-oic acid) (4.5 mg, 1.646 µmol, 29.3 % yield). HRMS (method D) [(M+3)/3]; 759.7487 (observed), 759.7462 (expected). Retension time ; 4.12 min.

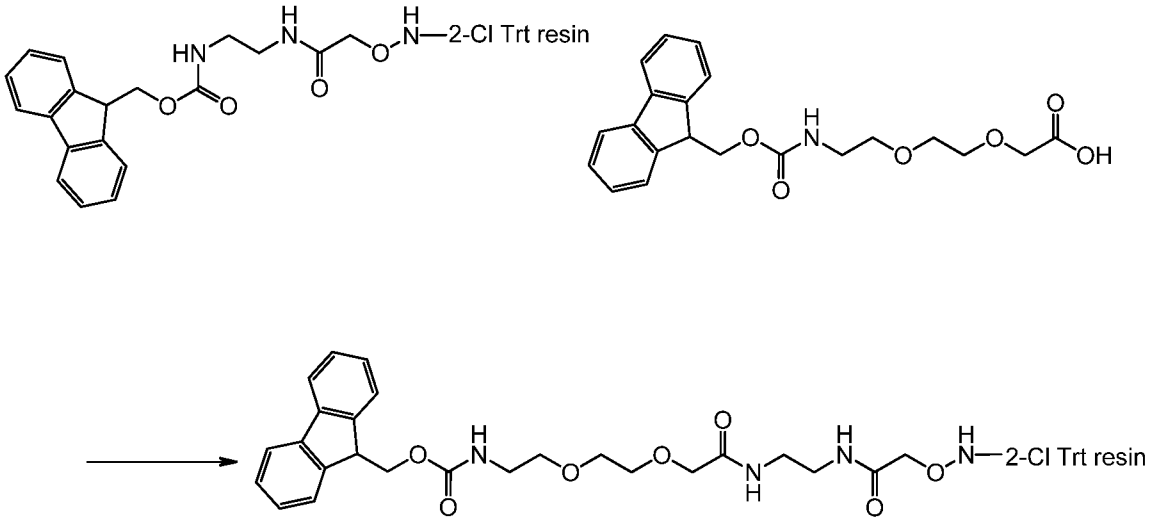
Synthesis of the (S)-1-(aminooxy)-19-carboxy-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaoctatriacontan-38-oic acid compound with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1):



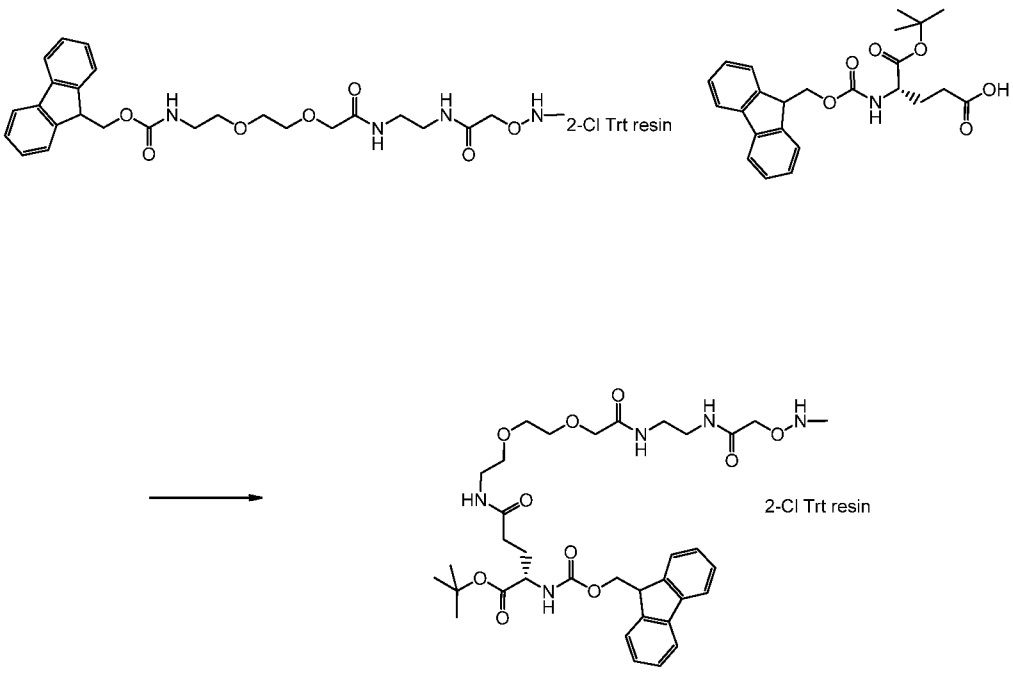
1-Chlorotrytyl chloride resin (1.55mmol/g) (0.500 g, 0.775 mmol) in 100mL glassware was swollen in DCM (20 ml) for 30min and it was drained. a suspension of 2-(aminooxy)acetic acid hemihydrochloride (0.338 g, 3.10 mmol) and DIPEA (1.354 ml, 7.75 mmol) in NMP (7 ml)/DCM (4 ml) was added to the resin, which was shaken for 5h. Solvent was drained. resin was rinsed with DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, 40mL), DCM(50mL), NMP(50mL) DCM(50mL) respectively. resulting resin was dried with KOH/NaOH overnight.



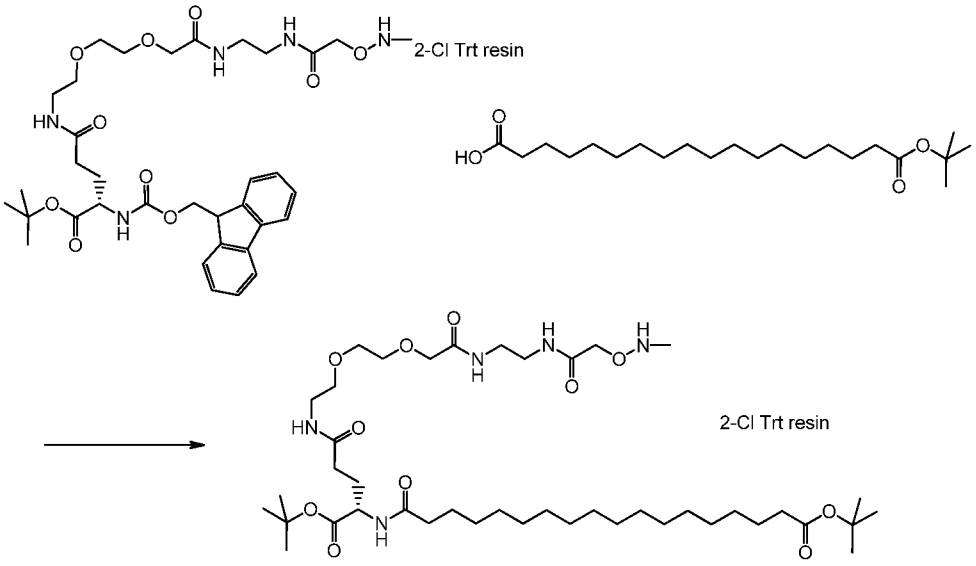
Resin (0.775 mmol) in 100mL glassware was swollen in DCM (20 ml) for 30min and it was drained. Into a suspension of (9H-fluoren-9-yl)methyl 2-aminoethylcarbamate hydrochloride (0.081 g, 0.775 mmol), HOAt (0.422 g, 3.10 mmol) and DIPEA (1.354 ml, 7.75 mmol) in NMP (8 ml) was added HBTU (1.176 g, 3.10 mmol) in NMP (2.5 ml), which was shaken for 2h at RT. solvent was drained. resin was rinsed with NMP(10mL), DCM(10mL) respectively. The resulting resin was dried overnight.



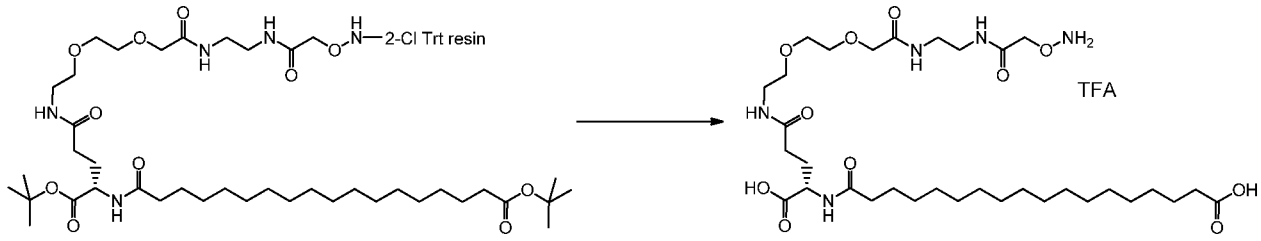
Resin (0.775 mmol) was charged into reaction vassel. 10mL of 20%PIPERIDINE/NMP was added into resin, which suspension was agitated at RT for 5min. After solvent was drained, additional 10mL of 20%PIPERIDINE/NMP was added and agitated for 20min at RT. Solution of HOAt (0.316 g, 2.325 mmol)and 1-(9H-fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-oic acid (0.896 g, 2.325 mmol) in NMP (8 ml) was added into resin and DIC (0.362 ml, 2.325 mmol) in NMP (1 ml) was added. reaction mixture was agitated for 2h at RT. Resin was filtered off and rinsed with NMP (10 ml) four times. The resulting resin was dried overnight.



Resin (0.775 mmol) was charged into reaction vassel. 10mL of 20%PIPERIDINE/NMP was added into resin, which suspension was agitated at RT for 5min. After solvent was drained, additional 10mL of 20%PIPERIDINE/NMP was added and agitated for 20min at RT. Solution of HOAt (0.316 g, 2.325 mmol)and Fmoc-Glu-OtBu (0.989 g, 2.325 mmol) in NMP (8 ml) was added into resin and DIC (0.362 ml, 2.325 mmol) in NMP (2.00 ml) was added. The reaction mixture was agitated for 2h at RT. Resin was filtered off and rinsed with NMP (10 ml) four times. The resulting resin was dried overnight.



Resin (0.775 mmol) was charged into reaction vassel. 10mL of 20% PIPERIDINE/NMP (0.775 mmol) was added into resin, which suspension was agitated at RT for 5min. after solvent was drained, additional 10mL of 20% PIPERIDINE/NMP (0.775 mmol) (0.775 mmol) was added and agitated for 20min at RT. Solution of 18-tert-butoxy-18-oxooctadecanoic acid (0.862 g, 2.325 mmol) and HOAt (0.316 g, 2.325 mmol) in NMP (8 ml) was added into resin and DIC (0.362 ml, 2.325 mmol) in NMP (2.00 ml) was added. The reaction mixture was agitated for 4h at RT. Resin was filtered off and rinsed with NMP (10 ml) four times. The resulting resin was dried overnight.



Resin (0.775 mmol) was treated with 20mL of cleavage cocktail (TFA/TIPS/water = 95/2.5/2.5) for 1.5h at RT. Resin was removed by filtration and rinsed with TFA. The filtrate was concentrated in vacuo. RP-HPLC with C18 column eluting 15-50%MeCN/ water with 0.1%TFA gave (S)-1-(aminooxy)-19-carboxy-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaoctatriacontan-38-oic acid with 2,2,2-trifluoroacetic acid (1:1) (207 mg, 0.294 mmol, 37.9 % yield). HRMS (method D) [M+1]; 704.4459 (observed), 704.4486 (expected). Retension time ; 2.63 min.

The polypeptides of Examples 1-66 can be purified and isolated as described supra and/or by a combination of conventional purification techniques such as solvent extraction, column chromatography, liquid chromatography and recrystallization. Where the polypeptide isolated in the above Examples is a free compound, it can be converted to a suitable salt by the known method. Therefore, Peptides of Examples 1-66 can be converted into their corresponding salt (e.g. hydrochloride, hydrobromide, sulfate, phosphate, citrate, acetate, lactate or another pharmaceutical salt for suitable for injection) with a polypeptide:salt ratio ranging from 1:1 to 1:4. For example, polypeptides of Examples 1-66 can be dissolved in water and converted into a salt using ion-exchange resins. Conversely where the isolated peptide is a salt, it can be converted to the free peptide by known method or directly to a different salt with the aid of ion-exchange resins.

The polypeptide in the examples below have been found to have EC_{50} values in the range of about 0.01 nM to about 1100 nM for APJ receptor potency. The polypeptides in the examples below have been found to have a plasma stability higher than 2 minutes, higher than 5 minutes, higher than 10 minutes, higher than 20 minutes, higher than 50 minutes and higher than 60 minutes.

It can be seen that the polypeptides of the invention are useful as agonist of the APJ receptor and therefore useful in the treatment of diseases and conditions responsive the activation of the APJ receptor, such as the diseases disclosed herein.

Having thus described exemplary embodiments of the present invention, it should be noted by those of ordinary skill in the art that the within disclosures are exemplary only and that various other alternatives, adaptations, and modifications may be made within the scope of the present invention. Accordingly, the present invention is not limited to the specific embodiments as illlustrated therein.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A polypeptide having the following formula I':

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from pE, R, Isn, Q, A, K, and 5-amino-valeric acid;
X2 is R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E or Orn;
X3 is P, A, a, p, 4-PhP, K, D, pipecolic acid, or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X4 is R, A, r, N-Me-R, F, E or cysteine wherein the side chain of cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at the X7 position;
X5 is L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF or F;

X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond forming either a monosulfide (-S-), a disulfide (-S-S-) or an amide bond (-NHC(O)- or -C(O)-NH-) or a linkage of Formula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; wherein Z is O, N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 or N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1 wherein R^1 is a fatty acid derivative and L^1 is a linker containing one or more amino acids and/or one or more –NH-C_{2-6}-alkylene-NH- units;
or alternatively X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 form an amide bond with the amino side chain of X6;
X7 is H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E or cysteine wherein the side chain of the cysteine forms a disulfide bond with the side chain of the cysteine at position X3 or with the side chain of the cysteine at position X4;
X8 is K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E or 4-amino-Isn;
X9 is G, N-Me-G, A, D, L, R or Aib;
X10 is P, A, p, 4-PhP or pipecolic acid,
X11 is M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F, Y, L, K, 3-PyA or Cha; and

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-β-3-F, I, A, a, K, Dap, H and E;

wherein:

Nle is L-norleucine;

D-hC is D-homocysteine

hC is L-homocysteine;

hF is L-homophenylalanine;

hK is L-lysine;

Nal is L-naphathaline;

Orn is ornithine;

Aib is α-aminoisobutyric acid;

Dab is (S)-diaminobutyric acid;

Dap is (S)-2,3-diaminopropionic acid;

M(O) is methionine sulfone;

Cha is (S)-β-cyclohexylalanine;

4-amino-Isn is 4-aminopiperidine-4-carboxylic acid;

Isn is isonipecotinoyl;

pE is L-pyroglutamic acid;

3-PyA is 3-(3-pyridyl)-L-alanine;

4-PhF is 4-Phenyl-L-phenylalanine;

wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; and

wherein the amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn is optionally linked to a lipophilic group via an amide bond;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

2. A polypeptide having the following formula:

X1-R-P-R-X5-X6-X7-X8-X9-P-X11-X12-X13

II

X1 is absent, pE, R, Q or Isn;

X5 is L or Cha;

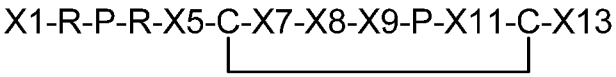
X7 is H, Aib, F, K(Lauroyl) or K(Palmitoyl);

X8 is K, F or 4-amino-Isn;
X9 is G or Aib;
X11 is Nle or Cha;
X13 is absent or is F, f, K(Lauroyl), K(Palmitoyl);
X6 and X12 are independently a natural or unnatural amino acid selected from C, c, hc, D-hc, K, D, Orn, Dab or E wherein the side chain of X6 and X12 are linked together via a covalent bond forming either a disulfide or an amide bond;and wherein the N-terminus and the C-terminus optionally form a ring together with 1, 2, 3 or 4 glycine amino acids; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

3. The polypeptide according to claim 1 or 2 wherein:
X6 and X12 are independently selected from K, Orn, Dab, E and D and wherein the side chain of X6 and X12 form together an amide bond; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

4. The polypeptide according to claim 1 or 2 wherein:
X6 and X12 are independently C wherein the side chain of X6 and X12 form together a disulfide bond; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

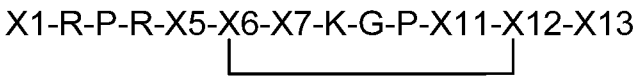
5. The polypeptide of claim 1, 2 or 4 having Formula III:



III;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

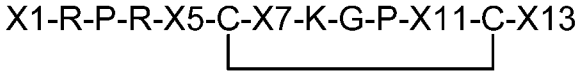
6. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 5 having Formula IV:



IV;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

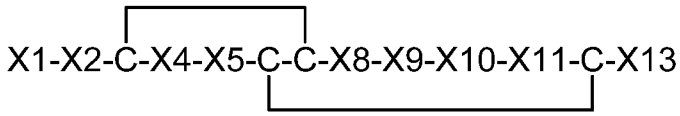
7. The polypeptide according to anyone of claims 1, 2 and 4 to 6 having Formula V:



V;

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

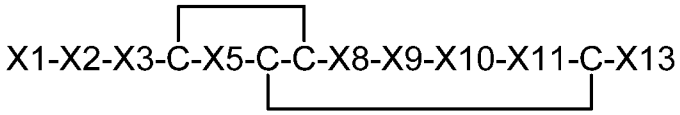
8. The polypeptide according to claim 1 having Formula VI:



VI

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

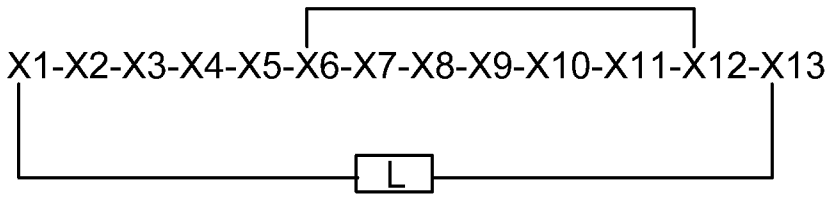
9. The polypeptide according to claim 1 having Formula VII:



VII

or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

10. The polypeptide according to claim 1, 2, 5, 6 or 7 having Formula VIII:

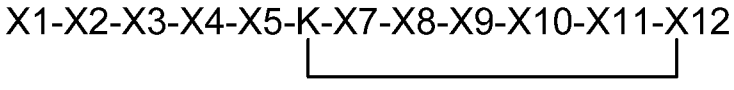


VIII

wherein the N-terminus of X1 and the C-terminus of X13 form a ring together with a linker L; and wherein L is (G)r, G is glycine and r is 1, 2, 3 or 4; or a salt of the polypeptide.

11. The polypeptide according to claim 10 wherein X1 is Q, X13 is F and r is 2; or a salt of the polypeptide.

12. The polypeptide according to claim 1 wherein X6 is K, X13 is absent and X12 is F or f wherein the C-terminus of X12 forms an amide bond with the amino side chain of X6; and having Formula IX:



IX,

or an ester, an amide or a salt of the polypeptide.

13. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 9 and 12 wherein X1 is pE; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

14. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 9 and 12 wherein X1 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

15. The polypeptide according to claim 14 wherein the N-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

16. The polypeptide according to claim 15 wherein the N-terminus is an amide of Formula –NHR and R is Acetyl, benzoyl, phenacyl, succinyl, octanoyl, 4-phenylbutanoyl, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; or a salt of the polypeptide.

17. The polypeptide of anyone of claims 1 to 9 and 12 wherein the N-terminus is an amide of Formula NHR1 wherein R1 is $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-C(O)-, Palmitoyl$(O2Oc)_p$, Myristoyl$(O2Oc)_p$, Lauroyl$(O2Oc)_p$ or Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; and wherein
p is an integer of 1 to 4;
m is an integer of 1 to 12;
Lauroyl(O2Oc) is $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;
Myristoyl(O2Oc) is $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;
Palmitoyl(O2Oc) is $C_{15}H_{31}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-; or a salt of the polypeptide

18. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 9 wherein X13 is F; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

19. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 9 wherein X13 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

20. The polypeptide according to claim 19 wherein the C-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

21. The polypeptide according to claim 20 wherein the C-terminus is an amide of Formula –C(O)-R2 and R2 is $-NH_2$, -NH-Me, -NH-NHBn, or $-NH-(CH_2)_2$-Ph; or a salt of the polypeptide.

22. The polypeptide according to anyone of claims 1-21 wherein X5 is L; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

23. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 7 and 10 to 22 wherein X7 is H; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

24. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 5 and 8 to 23 wherein X8 is K; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

25. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 5 and 8 to 24 wherein X9 is G; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

26. The polypeptide according to anyone of claims 1 to 25 wherein X11 is Nle, or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

27. The polypeptide according to claim 1 selected from:
*p*E-R-P-R-L-K*-H-F-G-P-Nle-D*-Phenethylamine,
*p*E-R-P-R-L-K*-H-F-G-P-Nle-E*-Phenethylamine,
*p*E-R-P-R-L-Orn*-H-F-G-P-Nle-D*-Phenethylamine,
*p*E-R-P-R-L-Dab*-H-F-G-P-Nle-D*-Phenethylamine,
*p*E-R-P-R-L-K*-F-K-G-P-Nle-F*,
*p*E-R-P-R-L-K*-F-K-G-P-Nle-f*,
Q-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-G-G,
*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*
*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*
*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH,*
H-Isn-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH,*
*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-Phenethylamine,
*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH,*
pE-R-P-R-Cha-C*-H-K-G-P-Cha-C*-F-*OH,*

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

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

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

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-F-G-P-Nle-C*-Phenethylamine,

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-Aib-P-Nle-C*-F-*OH,*

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-K(Palmitoyl)-*OH,*

*p*E-R-P-R-L-C*-K(Palmitoyl)-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*

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

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-K(Lauroyl)-*OH,*

*p*E-R-P-R-L-C*-K(Lauroyl)-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*

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

*p*E-R-C**-R-L-C*-C**-K-G-P-Nle-C*-F-*OH*;

*p*E-r-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-F-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-E-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-p-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-K-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-D-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-F-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-K-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-E-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-D-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-E-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-(4-PhF)-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-D-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-E-K-G-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-L-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-R-P-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-(Pipecolic acid)-Nle-C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(3-PyA)-C-F-*OH;*

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

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-NH_2;

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-NH_2;

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-*h*C*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-*h*C*-H-K-G-P-Nle-*h*C*-F-*OH;*

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)*-F-*OH;*

*p*E-R-P-R-L-(D-*h*C)*-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)*-F-*OH;*

MyristoylO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH;*

MyristoylO2OcO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH;*

MyristoylO2OcO2OcO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH;*

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

*p*E-R-P-R-L-c*-H-K-G-P-Nle-c*-F-*OH;and*

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

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

wherein the two amino acids labeled with "*" represent the amino acids forming a disulfide or amide bond via their side chain or terminus, respectively and wherein the two amino acids labeled with "**" represent the amino acids forming a disulfide via their side chain or an amide bond via their termini; and wherein the 2 amino acids labeled with "***" represent the amino acids forming a monosulfide bond or a –S-CH_2-C(O)-CH_2-S- linkage via their side chain; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

28. The polypeptide of claim 27 selected from:

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

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

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

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

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-Phenethylamine,

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

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

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

H-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*
H-R-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,*
H-Isn-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH,* and
*p*E-R-P-R-L-C*-H-F-G-P-Nle-C*-Phenethylamine; wherein the side chains of the 2 cysteine amino acids C* form together a disulfide bond; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

29. A method of treating or preventing a disease or disorder responsive to the agonism of the APJ receptor, in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide according to any one of claims 1 to 28 or an amide, an ester or a salt thereof.

30. The method of claim 29 wherein the disease or disorder is selected from acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia.

31. A polypeptide according to any one of claims 1 to 28 or an amide, an ester or a salt thereof, for use as a medicament.

32. A polypeptide according to any one of claims 1 to 28 or an amide, an ester of a salt thereof, for use in the treatment or prevention of a disease or disorder responsive to the agonism of the APJ receptor.

33. A polypeptide according to any one of claims 1 to 28 or an amide, an ester of a salt thereof, for use in the treatment of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic

attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) or preeclampsia.

34. A Combination comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide according to anyone of claims 1-28 or an amide, an ester or a salt thereof, and one or more therapeutically active co-agent.

35. A combination according to claim 34 wherein the co-agent is selected from inotropes, beta adrenergic receptor blockers, HMG-Co-A reductase inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, angiotensin converting enzyme (ACE) Inhibitors, calcium channel blockers (CCB), endothelin antagonists, renin inhibitors, diuretics, ApoA-I mimics, anti-diabetic agents, obesity-reducing agents, aldosterone receptor blockers, endothelin receptor blockers, aldosterone synthase inhibitors (ASI), a CETP inhibitor, anti-coagulants, relaxin, BNP (nesiritide) and/or a NEP inhibitor..

36. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide according to any one of claims 1 to 28 or an amide, an ester or a salt thereof, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

MIMÉTICOS DE APELINA SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias, el cual se ha presentado en formato ASCII por medio de la EFS-Web y se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Esta copia en ASCII, creada el 28 de junio de 2013, se denomina como PAT054961-WO-PCT_SL.txt y es de un tamaño de 85,581 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN:

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

La incidencia de insuficiencia cardíaca en el mundo occidental es de aproximadamente 1/100 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, por lo mismo, en el gasto cardíaco, es decir, el volumen efectivo de sangre expelida por cualquiera de los

ventrículos del corazón a través del tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, falla del corazón para mantener una circulación sanguínea adecuada, en donde la contractilidad cardíaca declina adicionalmente. Existen aproximadamente 500,000 hospitalizaciones por año para "insuficiencia cardíaca descompensada aguda" (ADHF) solamente en los EUA.

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

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

La apelina es el ligando endógeno para el receptor acoplado

con proteína-G (GPCR) previamente huérfano, APJ, también referido como receptor de apelina, receptor 1 tipo angiotensina, receptor 1 tipo angiotensina II, y similares. La senda de apelina/APJ se expresa ampliamente en el sistema cardiovascular, y se ha demostrado que la apelina tiene efectos cardiovasculares benéficos importantes en los modelos pre-clínicos. La administración de apelina aguda en los seres humanos provoca vasodilatación periférica y coronaria, y aumenta el gasto cardíaco (Circulation. 2010; 121: 1818-1827). Como un resultado, el agonismo de APJ está surgiendo como un objetivo terapéutico importante para los pacientes con insuficiencia cardíaca. Se piensa que la activación del receptor de apelina APJ aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona cardioprotección, sin los inconvenientes de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben una vida media y duración de acción muy corta *in vivo*.

Por consiguiente, es deseable identificar péptidos y polipéptidos que imiten la función de la apelina, pero que tengan un aumento en su *vida media* y demuestren una bioactividad equivalente o mayor que la apelina que se presenta naturalmente. Adicionalmente, es deseable identificar péptidos y polipéptidos análogos de apelina que exhiban un aumento en las limitaciones conformacionales, es decir, la capacidad para lograr y mantener un estado conformacional activo, de tal manera que los péptidos y polipéptidos puedan interactuar con sus receptores y/u otros objetivos de senda, sin la necesidad de pliegue o reposicionamiento

adicional. Existe una necesidad de usar dichos análogos de péptidos y polipéptidos, de composiciones que comprendan estos análogos, y de métodos para hacer y utilizar estas composiciones como agentes farmacéuticamente activos para tratar enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN:

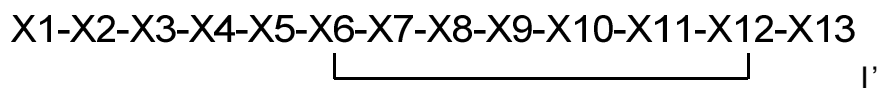
El objetivo de la presente invención es proporcionar péptidos y polipéptidos novedosos que sean útiles como agonistas de APJ, y que también posean cuando menos una de las siguientes mejoras sobre la apelina de tipo silvestre y otros análogos de apelina conocidos: vida media incrementada; mayor inmunidad a la degradación después de su administración y/o de su solubilización; y limitaciones conformacionales incrementadas, todo mientras que exhiban la misma o mayor actividad biológica que la apelina de tipo silvestre. Los péptidos y polipéptidos de esta invención, por consiguiente, son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, tales como insuficiencia cardíaca, trastornos y condiciones asociadas con insuficiencia cardíaca, y trastornos y condiciones que respondan a la activación de la actividad del receptor de APJ.

En una modalidad, los péptidos y polipéptidos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de un trastorno o condición asociada con insuficiencia cardíaca, o de un trastorno que responda a la activación (o al agonismo) de la actividad del receptor de APJ. En otra modalidad, los péptidos y

polipéptidos de la invención son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

La invención pertenece a los péptidos y polipéptidos, a las composiciones farmacéuticas, y a los métodos de elaboración y uso de los mismos, como se describe en la presente. Los ejemplos de los péptidos y polipéptidos de la invención incluyen los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal de los mismos, así como cualesquiera péptidos o polipéptidos específicamente enlistados en la presente, incluyendo, pero no limitándose a, los ejemplos experimentales.

La invención, por consiguiente, proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I'):



I'

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se

selecciona a partir de pE, R, Isn, Q, A, K, y ácido 5-amino-valérico;

X2 es R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E u Orn;

X3 es P, A, a, p, 4-PhP, K, D, ácido pipecólico, o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, A, r, N-Me-R, F, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF o F;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente, formando cualquiera de un enlace de monosulfuro (-S-), un enlace de disulfuro (-S-S-), o un enlace de amida (-NHC(O)- o -C(O)-NH-), o un enlace de la fórmula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; en donde Z es O, N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 o N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1, en donde R^1 es un derivado de ácido graso, y L^1 es un enlazador que contiene uno o más aminoácidos y/o una o más unidades de –NH-alquileno de 2 a 6 átomos de carbono-NH-;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o

con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

X8 es K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E o 4-amino-Isn;

X9 es G, N-Me-G, A, D, L, R o Aib;

X10 es P, A, p, 4-PhP o ácido pipecólico,

X11 es M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F y, L, K, 3-PyA o Cha; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-ß-3-F, I, A, a, K, Dap, H y E;

en donde:

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-naftilalanina;

Orn es ornitina;

Aib es ácido α-amino-isobutírico;

Dab es ácido (S)-diamino-butírico;

Dap es ácido (S)-2,3-diamino-propiónico;

M(O) es metionina-sulfona;

Cha es (S)-ß-ciclohexilalanina;

4-amino-Isn es ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico;

Isn es isonipecotinoílo;

pE es ácido L-piroglutámico;

3-PyA es 3-(3-piridil)-L-alanina;

4-PhF es 4-fenil-L-fenilalanina;

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y

en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida;

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

Como se explica adicionalmente en la presente, se utilizan las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en este campo para representar los residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando sea precedido con “D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra sea una letra mayúscula, se refiere al L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra sea una letra minúscula, se refiere al D-aminoácido.

Cualquiera de los residuos de aminoácidos anteriormente enlistados de la fórmula I’, o sus fórmulas relacionadas descritas en la presente, por ejemplo, las fórmulas I, II a IX, puede estar sustituido en una forma conservadora, en el entendido de que el péptido o polipéptido de la invención todavía conserve la actividad funcional y las propiedades estructurales (por ejemplo, la extensión de la vida media, protección de la degradación, limitación conformacional). Los principios y ejemplos de las sustituciones de aminoácidos conservadoras permisibles se explican adicionalmente

en la presente.

Los polipéptidos de la invención, mediante la activación del receptor de APJ, tienen utilidad en el tratamiento de:

insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

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

En otra modalidad, la invención pertenece a un método para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor de APJ, en un sujeto que necesite dicho tratamiento, el cual comprende: administrar al sujeto, una cantidad efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, de tal manera que se trate el trastorno o la enfermedad que responda a la activación del receptor de APJ en el sujeto.

En todavía otra modalidad, la invención pertenece a

composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o sal del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En todavía otra modalidad, la invención pertenece a combinaciones que incluyen un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, y las combinaciones farmacéuticas de uno o más agentes terapéuticamente activos.

En otra modalidad, la invención pertenece a un método para activación del receptor de APJ en un sujeto que lo necesite, el cual comprende: administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para los propósitos de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se especifique de otra manera, y siempre que sea apropiado, los términos utilizados en el singular también incluirán el plural y *viceversa*.

Como se utiliza en la presente, *"trastornos o enfermedades que responden a la modulación del receptor de APJ", "trastornos y condiciones que responden a la modulación de APJ", "trastornos y condiciones que responden a la modulación de la actividad del receptor de APJ", "trastornos que responden a la activación (o al agonismo) de la actividad del receptor de APJ"*, y términos similares

incluyen:

insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

Como se utiliza 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 es referida como “agonismo” del receptor de APJ, por ejemplo, mediante la administración de los péptidos y polipéptidos de la invención.

Como se utilizan en la presente, los términos “polipéptido" y "péptido” se utilizan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos enlazados entre sí. Excepto por las abreviaturas para los aminoácidos no comunes o no naturales estipulados en la Tabla 1 más adelante, se utilizan las abreviaturas de tres letras o de una letra reconocidas en este campo, para representar residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando es precedido con “D”, el aminoácido es

un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, se refiere al D-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, se refiere al L-aminoácido. Los grupos o cordones o abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar péptidos. Los péptidos se indican con el término N a la izquierda y la secuencia se escribe desde el término N hasta el término C.

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

Se pueden introducir ciertos aminoácidos no naturales mediante la tecnología descrita en Deiters y colaboradores, J Am Chem Soc 125: 11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301: 964-967, 2003; Wang y colaboradores, Science 292: 498-500, 2001; Zhang y colaboradores, Science 303: 371-373, 2004, o en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,083,970. Dicho de una manera breve, algunos de estos sistemas de expresión involucran mutagénesis dirigida al sitio para introducir un codón sin sentido, tal como un TAG ámbar, en el marco de lectura abierta que codifica un polipéptido de la invención. Estos vectores de expresión se introducen entonces en un huésped que pueda utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido, y se cargan con el aminoácido no natural de elección. Los aminoácidos no naturales particulares que son benéficos para el propósito de conjugar las fracciones con los polipéptidos de la invención incluyen aquéllos con

cadenas laterales de acetileno y azido.

Uno o más de los aminoácidos naturales o no naturales en un péptido de la invención se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química, tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso ($C_qH_{q+1}C(O)_2H$ en donde q es de 3 a 20), un enlazador para conjugación, funcionalización, u otra modificación, etc. Estas modificaciones se pueden hacer de una manera específica del sitio o no específica del sitio. En una modalidad 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 los D-aminoácidos adicionales, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido, pero estas modificaciones pueden conferir propiedades deseables, por ejemplo, una mejor actividad biológica, al péptido.

Estas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de la invención en relación con las proteínas de tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de unión para, por ejemplo, marcas y agentes de extensión de la vida media de la proteína, y para los propósitos de fijar estas variantes a la superficie de un soporte sólido.

En ciertas modalidades, estas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan para unir conjugados, por ejemplo, grupos PEG a los polipéptidos y/o péptidos de la

invención, para los propósitos, por ejemplo, de extender la vida media o de otra manera mejorar las propiedades biológicas de dichos polipéptidos y/o péptidos. Estas técnicas se describen adicionalmente en la presente.

En otras modalidades, estas modificaciones, por ejemplo, las 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 estas modalidades incluye la unión de ácidos grasos o compuestos de enlace de albúmina específicos para los polipéptidos y/o péptidos. En otras modalidades, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular, y se pueden unir en uno o más sitios sobre los polipéptidos.

En otras modalidades, estas modificaciones, por ejemplo, las modificaciones específicas del sitio, se utilizan como un medio de unión para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetrámeros. Estas moléculas de proteína multiméricas pueden tener adicionalmente grupos, tales como PEG, azúcares, y/o conjugados de PEG-colesterol unidos o para fusionarse ya sea amino-terminalmente o carboxi-terminalmente con otras proteínas, tales como Fc, albúmina de suero humano (HSA), etc.

En otras modalidades, estas modificaciones específicas del sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos, en donde la posición de la pirrolisina o del análogo de pirrolisina

incorporado específicamente en el sitio, o los aminoácidos que no se presentan naturalmente (para-acetil-Phe, para-azido-Phe), permite tener una orientación y unión controlada de estas proteínas, polipéptidos y/o péptidos sobre una superficie de un soporte sólido, o permite tener grupos, tales como PEG, azúcares y/o conjugados de PEG-colesterol unidos.

En otras modalidades, estas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio, las proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando de esta manera hetero-oligómeros, incluyendo, pero no limitándose a, heterodímeros y heterotrímeros. En otras modalidades, estas modificaciones específicas del sitio se utilizan para reticular específicamente en el sitio las proteínas, polipéptidos y/o péptidos, formando de esta manera conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido, conjugados de polipéptido-polipéptido, conjugados de polipéptido-péptido o conjugados de péptido-péptido. En otras modalidades, una modificación específica del sitio puede incluir un punto de ramificación para permitir que se una más de un tipo de molécula en un solo sitio de una proteína, polipéptido o péptido.

En otras modalidades, las modificaciones enlistadas en la presente se pueden hacer de una manera no específica del sitio, y pueden dar como resultado los conjugados de proteína-proteína, conjugados de proteína-polipéptido, conjugados de proteína-péptido, conjugados de polipéptido-polipéptido, conjugados de polipéptido-

péptido o conjugados de péptido-péptido de la invención.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona complejos que comprenden cuando menos un péptido o polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX enlazado a un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se enlace específicamente a un péptido o polipéptido como se da a conocer en la presente.

Un experto ordinario en este campo apreciará que se pueden hacer diversas sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras, en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente, sin disminuir necesariamente su actividad. Como se utiliza en la presente, “aminoácido comúnmente utilizado como un sustituto del mismo” incluye las sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). Para los propósitos de la sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares (hidrofílicos) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los ejemplos de las sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución de un L-aminoácido por su D-aminoácido correspondiente, la sustitución de cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tengan una

cadena lateral que contenga tiol, la sustitución de una lisina por homolisina, ácido diamino-butírico, ácido diamino-propiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tengan una cadena lateral que contenga amino, o la sustitución de una alanina por norvalina, o similares.

El término “aminoácido", como se utiliza en la presente, se refiere a los aminoácidos que se presentan naturalmente, a los aminoácidos no naturales, a los análogos de aminoácidos, y a los miméticos de aminoácidos funcionen de una manera similar a los aminoácidos que se presenten naturalmente, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite tales formas estereoisoméricas. Los aminoácidos son referidos en la presente ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos, o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

El término “que se presenta naturalmente” se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. De una manera similar, “que no se presenta naturalmente", “no natural", y similares, como se utilizan en la presente, se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado o sintetizado estructuralmente por el hombre. Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el término “que se presenta naturalmente” 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)).

Los términos “aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se utilizan en la presente, pretenden representar de una manera intercambiable las estructuras de aminoácidos que no pueden ser generadas biosintéticamente en cualquier organismo utilizando genes no modificados o modificados a partir de cualquier organismo, ya sean iguales o diferentes. Los términos se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia de la proteína apelina (de tipo silvestre) que se presenta naturalmente, o en las secuencias de la presente invención. Éstos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos y/o análogos de aminoácidos modificados que no son uno de los 20 aminoácidos que se presentan naturalmente, selenocisteína, pirrolisina (PYL), o pirrolina-carboxi-lisina (Pcl, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente del TCP Número WO2010/48582). Tales residuos de aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante la sustitución de los aminoácidos que se presentan naturalmente, y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de la proteína apelina (de tipo silvestre) que se presenta naturalmente, o en las secuencias de la invención. El residuo de aminoácido no natural también se puede incorporar de tal manera

que se imparta una funcionalidad deseada a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad para enlazarse a una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utiliza en relación con los aminoácidos, el símbolo “U” significará “aminoácido no natural" y "aminoácido innatural", como se utilizan en la presente.

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

Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxi-prolina, γ-carboxi-glutamato, O-fosfoserina, ácido

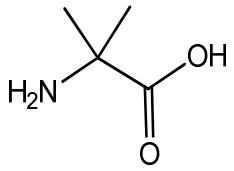
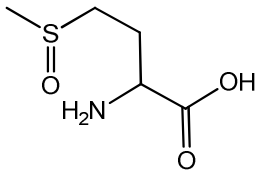
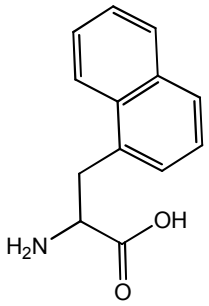
azetidin-carboxílico, ácido 2-amino-adípico, ácido 3-amino-adípico, beta-alanina, ácido amino-propiónico, ácido 2-amino-butírico, ácido 4-amino-butírico, ácido 6-amino-caproico, ácido 2-amino-heptanoico, ácido 2-amino-isobutírico, ácido 3-amino-isobutírico, ácido 2-amino-pimélico, terbutil-glicina, ácido 2,4-diamino-isobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diamino-pimélico, ácido 2,3-diamino-propiónico, N-etil-glicina, N-metil-glicina, N-etil-asparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi-prolina, 4-hidroxi-prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metil-alanina, N-metil-glicina, N-metil-isoleucina, N-metil-pentil-glicina, N-metil-valina, naftilalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentil-glicina, ácido pipecólico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye los aminoácidos que se presentan naturalmente que son metabolitos en ciertos organismos, pero que no son codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Estos aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, ornitina, D-ornitina, y D-arginina.

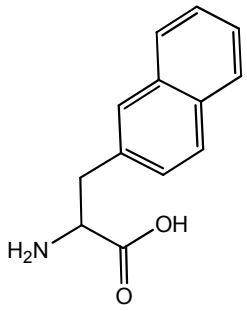
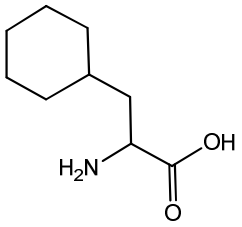
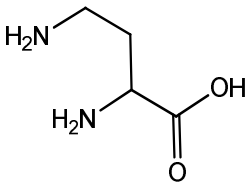
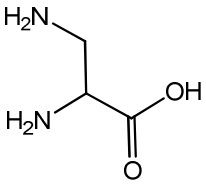
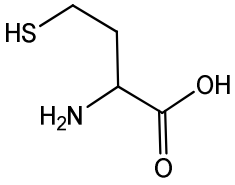
El término "análogo de aminoácido", como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente, a manera de ejemplo solamente, un α-carbono que se enlaza a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Los análogos de aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que son químicamente bloqueados, de una manera reversible o irreversible, o que se modifican químicamente su grupo carboxilo C-terminal, su grupo amino N-terminal, y/o sus grupos

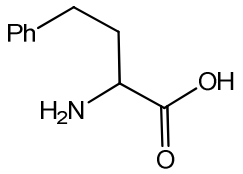
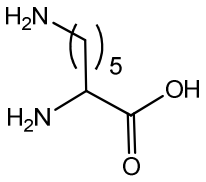
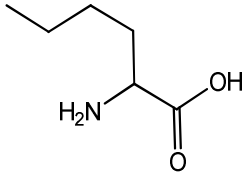
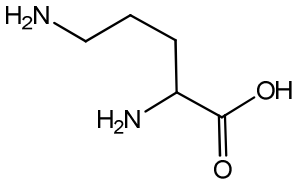
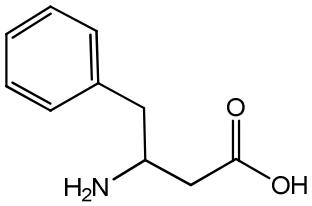
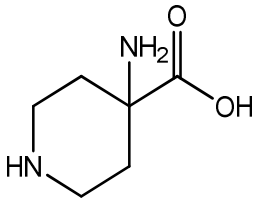
funcionales de cadena lateral. Estos análogos incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de metionina, metionina-sulfona, S-(carboxi-metil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboxi-metil)-cisteína, S-(carboxi-metil)-cisteína-sulfona, (beta-metil-éster) de ácido aspártico, N-etil-glicina, alanina-carboxamida, homoserina, norleucina, y metionina-metil-sulfonio.

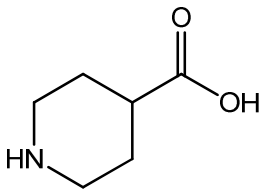
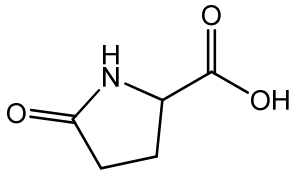
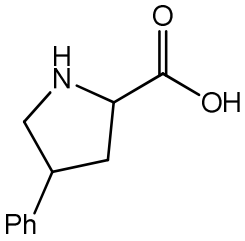
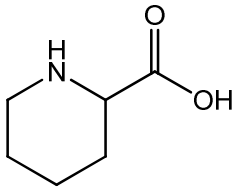
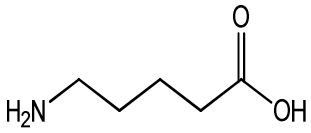
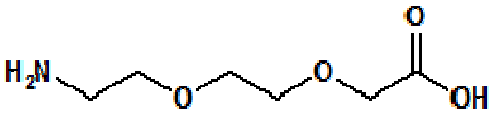
Tabla 1

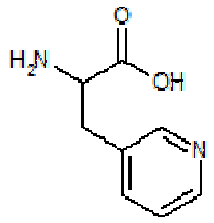
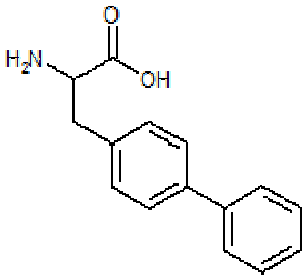
Aminoácidos innaturales o no naturales como se describen en la invención:

Símbolo	Nombre	Estructura
Aib	Ácido α-amino-isobutírico	
M(O)	Metionina-sulfona	
1-Nal	1-Naftilalanina	

Símbolo	Nombre	Estructura
2-Nal	2-Naftilalanina	
Cha	ß-ciclohexil-alanina	
Dab	Ácido diamino-butírico	
Dap	Ácido 2,3-diamino-propiónico	
hC	Homocisteína	

Símbolo	Nombre	Estructura
hF	Homofenil-alanina	
hK	Homolisina	
Nle	Norleucina	
Orn	Ornitina	
ß-3-F	ß-3-fenilalanina	
4-amino-Isn	Ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico (el grupo 4-amino forma el enlace peptídico)	

Símbolo	Nombre	Estructura
Isn	Ácido Isonipecotinoico	
pE	Ácido piroglutámico	
4-PhP	4-fenil-prolina	
	Ácido pipecolínico	
	Ácido 5-amino-valérico	
O2Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico	

Símbolo	Nombre	Estructura
3-PyA	3-(3-piridil)-alanina	
4-PhF	4-fenil-fenilalanina	

Nal se refiere tanto a 1-Naftilalanina como a 2-Naftilalanina, de preferencia a 2-naftilalanina.

4-Fenilprolina se refiere tanto a *cis*- como *trans*-4-fenil-prolina, de preferencia a *trans*-4-fenil-prolina.

Como se utiliza en la presente, el término “amida” se refiere a un derivado de amida del grupo de ácido carboxílico en el término C (por ejemplo, -C(O)NH_2, -C(O)NH-alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,- C(O)NH-alquilo de 1 a 2 átomos de carbono-fenilo, -C(O) NH-NHBn o -C(O)N(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)$_2$).

El término “amida” también se refiere a un derivado del grupo amino en el término N (por ejemplo, -NHC(O)-alquilo de 1 a 16 átomos de carbono, -NHC(O)$(CH_2)_n$Ph (n es un entero de 1 a 6),

-NHC(O)$(CH_2)_2CO_2H$, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$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_2 CH_2NHC(O)-NH- o $CH_3(OCH_2CH_2)_m$C(O)NH-(m es un entero de 1 a 12).

Como se utiliza en la presente, el término “éster” se refiere a una forma de un derivado de éster del grupo de ácido carboxílico en el término C (por ejemplo, -COOR), en donde R del éster se refiere a los grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, tales como los grupos metilo, etilo, propilo normal, isopropilo, butilo normal, etc., cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono, tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., los grupos arilo de 6 a 10 átomos de carbono, tales como fenilo, α-naftilo, etc., los grupos arilo de 6 a 10 átomos de carbono-alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, los grupos fenil-alquilo de 1 a 2 átomos de carbono, tales como bencilo, fenetilo, benzhidrilo, etc., y los grupos α-naftil-alquilo de 1 a 2 átomos de carbono, tales como α -naftil-metilo, y similares. También se puede hacer mención del pivaloiloxi-metil-éster y similares, los cuales son comúnmente utilizados como ésteres para su administración oral. Cuando los polipéptidos de la invención poseen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en posiciones diferentes del término C, esos polipéptidos, en donde estos grupos están amidados o esterificados, también caen bajo la categoría del polipéptido de la invención. En tales casos, los ésteres, por ejemplo, pueden ser las mismas clases de ésteres que los ésteres C-

terminales mencionados anteriormente.

El término “APJ” (también referido como “receptor de apelina", “receptor 1 tipo angiotensina", “receptor 1 tipo angiotensina II", y similares), indica un residuo380, un dominio transmembrana 7, un receptor acoplado con *Gi* cuyo gen se localiza sobre el brazo largo del cromosoma 11 en los seres humanos (NCBI secuencia de referencia: NP_005152.1, y codificada por NCBI secuencia de referencia: NM_005161). El APJ fue primeramente clonado en 1993 a partir del ADN genómico humano utilizando cebadores de oligonucleótidos degenerados (O'Dowd y colaboradores, Gene, 136: 355-60, 1993), y comparte una homología significativa con el receptor 1 tipo angiotensina II. A pesar de esta homología, sin embargo, la angiotensina II no se enlazan al APJ. Aunque fue huérfano durante muchos años, el ligando endógeno se aisló y se nombró como apelina (Tatemoto y colaboradores, Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

El término “apelina" indica una pre-proteína de 77 residuos (NCBI secuencia de referencia: NP_0059109.3, y codificada por NCBI secuencia de referencia: NM_017413.3), que llega a procesarse en formas biológicamente activas de los péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, referido como “apelina-36", comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamatada de un 13mer de apelina (apelina-13), referida como “Pyr-1-apelina-13 o Pyr^{1}-apelina-13”. Se

describen diferentes formas de apelina, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,492,324B1.

Polipéptidos de la invención:

En la presente se describen diferentes modalidades de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada modalidad se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar modalidades adicionales.

En la modalidad 1, la invención, por consiguiente, proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I'):

$$X1\text{-}X2\text{-}X3\text{-}X4\text{-}X5\text{-}\underbrace{X6\text{-}X7\text{-}X8\text{-}X9\text{-}X10\text{-}X11}\text{-}X12\text{-}X13 \qquad I'$$

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se selecciona a partir de pE, R, Isn, Q, A, K, y ácido 5-amino-valérico;

X2 es R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E u Orn;

X3 es P, A, a, p, 4-PhP, K, D, ácido pipecólico, o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, A, r, N-Me-R, F, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF o F;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por

medio de un enlace covalente, formando ya sea un enlace de disulfuro o de amida;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

X8 es K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E o 4-amino-Isn;

X9 es G, N-Me-G, A, D, L, R o Aib;

X10 es P, A, p, 4-PhP o ácido pipecólico,

X11 es M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F y, L, K, 3-PyA o Cha; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-ß-3-F, I, A, a, K, Dap, H y E;

en donde:

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-naftilalanina;

Orn es ornitina;

Aib es ácido α-amino-isobutírico;

Dab es ácido (S)-diamino-butírico;

Dap es ácido (S)-2,3-diamino-propiónico;

M(O) es metionina-sulfona;

Cha es (S)-ß-ciclohexilalanina;

4-amino-Isn es ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico;

Isn es isonipecotinoílo;

pE es ácido L-piroglutámico;

3-PyA es 3-(3-piridil)-L-alanina;

4-PhF es 4-fenil-L-fenilalanina;

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y

en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida;

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

En la modalidad 2, la invención, por consiguiente, proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 (I)

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se selecciona a partir de pE, R, Q, A, K, ácido 5-amino-valérico e Isn;

X2 es R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK u Orn;

X3 es P, A, a, p, 4-PhP, ácido pipecólico, o cisteína, en donde

la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, A, r, N-Me-R o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, Cha, A, D-L, N-Me-L o F;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

X8 es K, k, F, f, A, hF, N-Me-R o 4-amino-lsn;

X9 es G, N-Me-G, A o Aib;

X10 es P, A, p, 4-PhP o ácido pipecólico,

X11 es M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F y, L, K o Cha; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-ß-3-F, I, A, a, K, Dap

en donde:

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-naftilalanina;

Orn es ornitina;

Aib es ácido α-amino-isobutírico;

Dab es ácido (S)-diamino-butírico;

Dap es ácido (S)-2,3-diamino-propiónico;

M(O) es metionina-sulfona;

Cha es (S)-ß-ciclohexilalanina;

4-amino-Isn es ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico;

Isn es isonipecotinoílo;

pE es ácido L-piroglutámico;

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y

en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida;

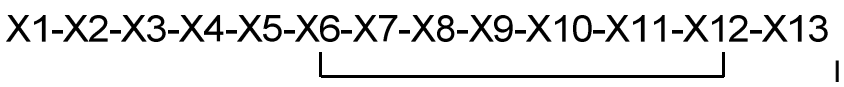
o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos.

En un aspecto de la modalidad 1 o 2, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I o I', en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un ácido graso por medio de un enlace de amida.

En un aspecto adicional de esta modalidad, el ácido graso se selecciona a partir de Lauroílo, Miristoílo o Palmitoílo, en donde Lauroílo es $C_{11}H_{23}C(O)$-, Miristoílo es $C_{13}H_{27}C(O)$- y Palmitoílo es $C_{15}H_{31}C(O)$-. De una manera alternativa, el CH_3 terminal del ácido graso (tal como Lauroílo, Miristoílo o Palmitoílo) se puede oxidar hasta su ácido carboxílico correspondiente.

En un aspecto de la modalidad 1 o 2, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I o I', en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida, en donde el grupo lipofílico se selecciona a partir de un ácido graso como se describe anteriormente, y Lauroílo(O2Oc), Miristoílo(O2Oc), y Palmitoílo(O2Oc), y en donde el Lauroílo(O2Oc) es $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$CH_2C(O)$-; el Miristoílo(O2Oc) es $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$CH_2C(O)$-; el Palmitoílo(O2Oc) es $C_{15}H_{31}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$CH_2C(O)$-. De una manera alternativa, la fracción CH_3 terminal del ácido graso (tal como Lauroílo, Miristoílo o Palmitoílo) se puede oxidar hasta su ácido carboxílico correspondiente.

En la modalidad 3, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I o I':



en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se

selecciona a partir de pE, R, Q, A, K(Palmitoílo), K(Miristoílo), K(Lauroílo), ácido 5-amino-valérico e Isn;

X2 es R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK u Orn;

X3 es P, A, a, p, 4-PhP, ácido pipecólico, o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, A, r, N-Me-R o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, Cha, A, D-L, N-Me-L o F;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K(Lauroílo), K(Palmitoílo), Nal, F, P, Dap, N o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

X8 es K, k, F, f, A, hF, N-Me-R o 4-amino-Isn;

X9 es G, N-Me-G, A o Aib;

X10 es P, A, p, 4-PhP o ácido pipecólico,

X11 es M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F y, L, K(Palmitoílo) o Cha; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-ß-3-F, I, A, a, K(Lauroílo), K(Miristoílo), K(Palmitoílo), K(O2Oc-Palmitoílo), Dap(Palmitoílo);

en donde:

K(Lauroílo) es N-ε-lauroil-L-lisina;

K(Palmitoílo) es N-ε-palmitoil-L-lisina;

K(Miristoílo) es N-ε-miristoil-L-lisina;

K(O2Oc-Palmitoilo) es N-ε-(O2Oc-Palmitoil)-L-lisina; y

Palmitoílo(O2Oc) es $C_{15}H_{31}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)-$;

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-naftilalanina;

Orn es ornitina;

Aib es ácido α-amino-isobutírico;

Dab es ácido (S)-diamino-butírico;

Dap es ácido (S)-2,3-diamino-propiónico;

M(O) es metionina-sulfona;

Cha es (S)-ß-ciclohexilalanina;

4-amino-Isn es ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico;

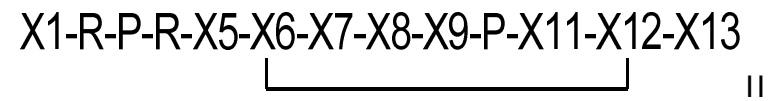
Isn es isonipecotinoílo;

pE es ácido L-piroglutámico;

y en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina;

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

En la modalidad 4, la invención pertenece a un péptido o un polipéptido de acuerdo con la modalidad 1, 2 o 3, que tiene la fórmula II (SEQ ID NO: 1):



II

X1 está ausente, o es pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

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

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

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

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente; o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6; y

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente

equivalente a los mismos.

En la modalidad 5, la invención pertenece a un péptido o un polipéptido de acuerdo con la modalidad 4, en donde:

X1 está ausente, o es pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

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

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

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

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente; o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6; y

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

En la modalidad 6, un aspecto adicional de la modalidad 4, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula II, en donde:

X1 está ausente, o es pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

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

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

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

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente; y en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos.

En todavía un aspecto adicional de cualquiera de las modalidades anteriores, más específicamente de cualquiera de las modalidades 1 a 6, la invención pertenece a un péptido y polipéptido de la fórmula I, I' o II, en donde X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos.

En la modalidad 7, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, más específicamente de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde X6 y X12 se seleccionan

independientemente a partir de K, Orn, Dab, E y D, y en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman entre sí un enlace de amida; o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido. En un aspecto adicional de esta modalidad, X6 es K, Orn o Dab, y X12 es E o D, y las cadenas laterales de X6 y X12 forman un enlace de amida. En todavía otro aspecto de esta modalidad, X6 es K, y X12 es E o D.

En la modalidad 8, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, más específicamente de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde X6 y X12 son independientemente C, c, D-hC o hC, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas un enlace de disulfuro; o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido. En un aspecto adicional de esta modalidad, X6 y X12 son C.

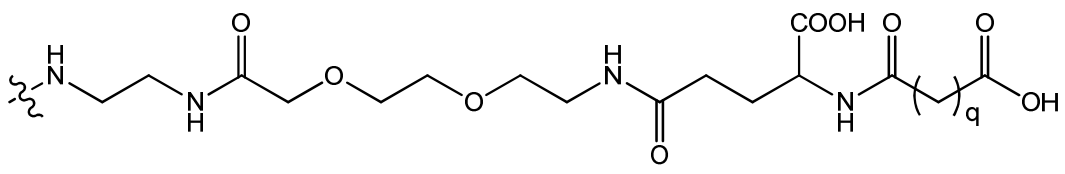
En la modalidad 8A, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, más específicamente de cualquiera de las modalidades 1 a 6, en donde X6 y X12 son independientemente C, c, D-hC o hC, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas un enlace de monosulfuro (-S-); o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido. En un aspecto adicional de esta modalidad, X6 y X12 son C.

En la modalidad 8B, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, más específicamente de cualquiera de las

modalidades 1 a 6, en donde X6 y X12 son independientemente C, c, D-hC o hC, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas una fracción de enlace de la fórmula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; en donde =Z es =O, =N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 o =N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1, en donde R^1 es un derivado de ácido graso, y L^1 es un enlazador que contiene uno o más aminoácidos y/o una o más unidades de –NH-alquileno de 2 a 6 átomos de carbono-NH-; o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido. En un aspecto adicional de esta modalidad, X6 y X12 son C.

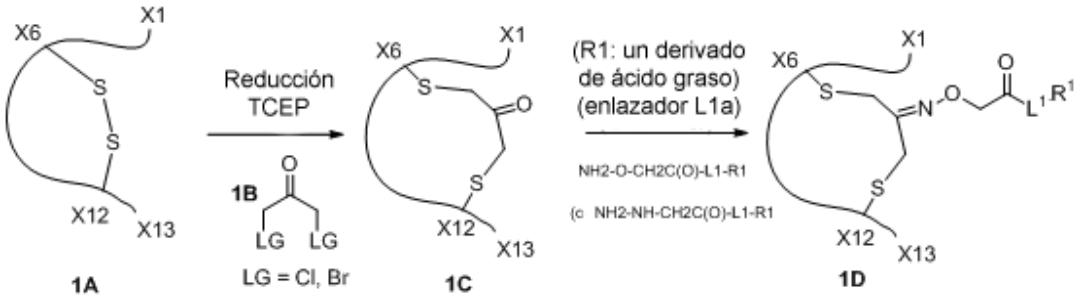
L1 es un enlazador orgánico adecuado que conecta un derivado de ácido graso al polipéptido por medio de un enlace de éster o de amida. Típicamente, el enlazador contiene una o más fracciones de aminoácidos, tales como, por ejemplo, una unidad (O2Oc) o ácido glutámico, o contiene unidades de –NH-alquileno de 2 a 6 átomos de carbono-NH-diamino, o una combinación de los mismos. R^1 es un grupo modificador de propiedades, tal como un derivado de ácido graso, el cual se puede agregar para aumentar la vida media del polipéptido. En un aspecto de esta modalidad, R1 es un ácido graso de la fórmula $C_qH_{q+1}C(O)_2H$ en donde q es de 3 a 20. Opcionalmente la unidad CH_3 terminal se puede oxidar hasta su ácido carboxílico correspondiente.

En una modalidad particular, -L^1-R^1 es de la fórmula:



q es un entero de 3 a 20. De preferencia, q es un entero de 12 a 18.

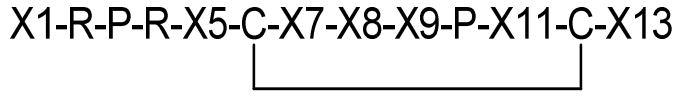
Un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, en donde X6 y X12 son independientemente C, c, D-hC o hC, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas una fracción de enlace de la fórmula $-S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-$; en donde =Z es =O, $=N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1$ o $=N-NH-CH_2C(O)-L^1-R^1$, se puede sintetizar de acuerdo con el esquema 1:



Esquema 1

La reducción del enlace de disulfuro del polipéptido en (1A) es seguida por una reacción nucleofílica del compuesto di-electrofílico (1B) formando el polipéptido (1C). La funcionalidad de cetona del polipéptido (1C) se condensó fácilmente con una oxiamina o hidrazina para generar el polipéptido 1D.

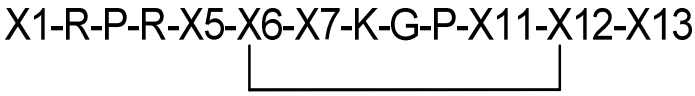
En la modalidad 9, ciertos polipéptidos de la invención incluyen los péptidos o polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 6 y 8, que tienen la fórmula III (SEQ ID NO: 2):



III;

o una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En la modalidad 9A, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de la fórmula III, en donde las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (-S-S-), un enlace de monosulfuro (-S-), o un enlace de la fórmula $–S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-$, en donde Z es como se define anteriormente. En un aspecto adicional de la modalidad 9 o 9A, la invención incluye los péptidos o polipéptidos de la fórmula III, en donde las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (-S-S-).

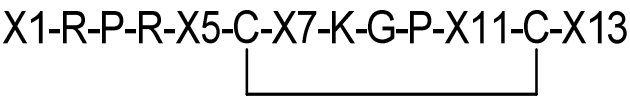
En la modalidad 10, ciertos péptidos y polipéptidos de la invención incluyen los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 9, que tienen la fórmula IV (SEQ ID NO: 3):



IV;

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

En la modalidad 11, ciertos polipéptidos de la invención incluyen los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 6, y 8 a 10, que tienen la fórmula V (SEQ ID NO: 4):

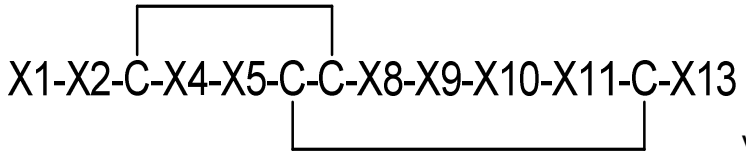


V;

o una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En la modalidad 11A, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos

de la fórmula V, en donde las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (-S-S-), un enlace de monosulfuro (-S-), o un enlace de la fórmula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-, en donde Z es como se define anteriormente. En un aspecto adicional de la modalidad 11 u 11A, la invención incluye los péptidos o polipéptidos de la fórmula V, en donde las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (-S-S-).

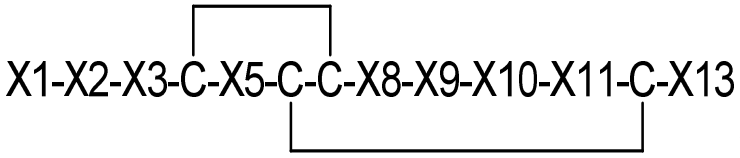
En la modalidad 12, la invención pertenece a los péptidos o polipéptidos bicíclicos de las fórmulas I o I' (de acuerdo con la modalidad 1, 2 o 3), en donde X3 es cisteína, y en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7. Esta modalidad está representada por los péptidos y polipéptidos de la fórmula VI (SEQ ID NO: 5):



VI

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

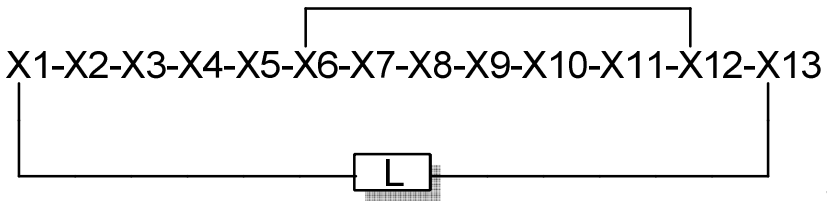
En la modalidad 13, la invención pertenece a los péptidos o polipéptidos bicíclicos de la fórmula I o I' (de acuerdo con la modalidad 1, 2 o 3), en donde X4 es cisteína, y en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7. Esta modalidad está representada por los péptidos y polipéptidos de la fórmula VII (SEQ ID NO: 6):



VII

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

En la modalidad 14, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a V, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 11; en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos. Esta modalidad está representada por el péptido o polipéptido que tiene la fórmula VIII:



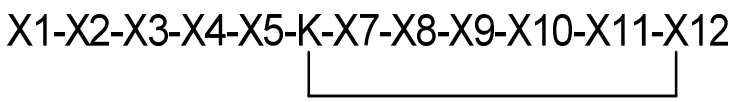
VIII

en donde L es (G)r, G es glicina, y r es 1, 2, 3 o 4; o una sal del polipéptido.

En la modalidad 15, un aspecto adicional de la modalidad 14, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la fórmula VIII, en donde X1 es Q, X13 es F, y r es 2 o un éster, una amida o una sal del mismo.

En la modalidad 16, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de acuerdo con la fórmula I o I', de acuerdo con la modalidad 1, 2 o 3, en donde X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F

o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6. Esta modalidad está representada por un péptido o polipéptido de la fórmula IX:



IX,

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

Cualquiera de los residuos de aminoácidos enlistados anteriormente o más adelante de la fórmula I', o sus fórmulas relacionadas, y todas las modalidades descritas en la presente, por ejemplo, las fórmulas I, II a IX, pueden estar sustituidos en una forma conservadora, en el entendido de que el péptido o polipéptido de la invención todavía conserve las propiedades de actividad funcional y estructural (por ejemplo, la extensión de la vida media, protección de la degradación, limitación conformacional). Los principios y ejemplos de las sustituciones de aminoácidos conservadoras permisibles se explican adicionalmente en la presente.

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

En la modalidad 17, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I', I a VII y IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13 y 16) o una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X1 es pE.

En la modalidad 18, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII y IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13 y 16), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X1 está ausente; o a una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En un aspecto de esta modalidad, el término N del péptido es una amida. En la modalidad 19, un aspecto adicional de la modalidad 18, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII y IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde el X1 está ausente, y el término N es una amida de la fórmula –NHR, y R es $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-$C(O)$-, Palmitoílo$(O2Oc)_p$, Miristoílo$(O2Oc)_p$, Lauroílo$(O2Oc)_p$ o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-, Acetilo, benzoílo, fenacilo, succinilo, octanoílo, 4-fenil-butanoílo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; y en donde:

p es un entero de 1 a 4;

m es un entero de 1 a 12;

Lauroílo$(O2Oc)_p$ es $C_{11}H_{23}C(O)[NH\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C(O)]_p$-;

Miristoílo$(O2Oc)_p$ es $C_{13}H_{27}C(O)[NH\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C(O)]_p$-;

Palmitoílo$(O2Oc)_p$ es $C_{15}H_{31}C(O)[NH\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}C(O)]_p$-. En un aspecto particular de esta modalidad, R es acetilo,

benzoílo, fenacilo, succinilo, octanoílo, 4-fenil-butanoílo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-.

En la modalidad 20, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII y IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13 y 16), o a una amida, un éster o una sal del mismo, en donde el término N es una amida de la fórmula NHR1, en donde R1 es $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O-CH_2CH_2)_m$-C(O)-, Palmitoílo(O2Oc), Miristoílo(O2Oc), Lauroílo(O2Oc) o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; y en donde m, Lauroílo(O2Oc), Miristoílo (O2Oc), y Palmitoílo(O2Oc) se definen anteriormente.

En la modalidad 21, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X13 es F; o a una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

En la modalidad 22, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 13), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X13 está ausente; o a una amida, un éster, o una sal del polipéptido. En la modalidad 23, un aspecto de la modalidad 22, El término C es una amida. En la modalidad 24, un aspecto adicional de la modalidad 23,

la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde el término C es una amida de la fórmula –C(O)R2, y R2 es $-NH_2$, -NH-Me, -NH-NHBn, o $-NH-(CH_2)_2$-Ph. En un aspecto preferido de la modalidad 23, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a VII, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde el término C es una amida de la fórmula –C(O)R2, y R2 es $-NH-(CH_2)_2$-Ph.

En la modalidad 25, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 25), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X5 es L.

En la modalidad 26, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a V, VIII y IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 11 y 14-25), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X7 es H.

En la modalidad 27, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a III y VI a IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente

(es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 9 y 12 a 26), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X8 es K o F. En un aspecto adicional de esta modalidad, X8 es K.

En la modalidad 28, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a III y VI a IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 9 y 12 a 27), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X9 es G.

En la modalidad 29, la invención pertenece a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o a cualesquiera otras clases y subclases descritas anteriormente (es decir, de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 28), o a una amida, un éster o una sal de los mismos, en donde X11 es Nle.

En la modalidad 30, la invención, por consiguiente, proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I'):

$$X1\text{-}X2\text{-}X3\text{-}X4\text{-}X5\text{-}\underline{X6\text{-}X7}\text{-}X8\text{-}X9\text{-}X10\text{-}X11\text{-}X12\text{-}X13 \qquad I'$$

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se selecciona a partir de pE, R, Isn y Q;

X2 es R, r, F o E;

X3 es P, p, K, D o 4-PhF; o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, F, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, K, D o 4-PhF;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente, formando ya sea un enlace de disulfuro o de amida;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, Aib, K, E, F o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

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

X9 es G, D, L, R o Aib;

X10 es P o ácido pipecólico,

X11 es Nle o 3-PyA; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, K, H y E;

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y

en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab,

Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida;

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

En la modalidad 31, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la modalidad 1, 2 o 3, en donde tres de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En la modalidad 32, la invención pertenece a un péptido o polipéptido de la modalidad 1, 2 o 3, en donde cuatro de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13.

En otra modalidad, los aminoácidos X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8. X9, X10, X11, X12 y X13 son aquéllos definidos por los aminoácidos X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8. X9, X10, X11, X12 y X13 en la sección de Ejemplos más adelante.

En otra modalidad, los polipéptidos individuales de acuerdo con la invención son aquéllos enlistados en la sección de Ejemplos más adelante, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

A menos que se especifique de otra manera, el término “polipéptido de la presente invención” se refiere a un polipéptido de la fórmula (I’), y de las subfórmulas de la misma (fórmulas I, II a IX); o a una amida, un éster o una sal del mismo.

A menos que se especifique de otra manera, los términos “polipéptidos de la presente invención", “péptidos de la presente invención", “agonistas peptídicos de apelina", y similares, se refieren

a los péptidos y polipéptidos de la fórmula I' y de las subfórmulas de la misma (fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII o IX); o a una amida, un éster o una sal de los mismos. Los péptidos y polipéptidos de la invención demuestran una actividad y/o estabilidad en plasma sustancialmente equivalente o mejorada sobre los péptidos y polipéptidos de apelina conocidos descritos en la presente, incluyendo, pero no limitándose a, apelina de tipo silvestre, apelina-13, y pyr-1-apelina-13.

Los péptidos y polipéptidos de la invención también abarcan los péptidos y polipéptidos que son cuando menos aproximadamente el 95 por ciento idénticos a los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I', I a IX, o a una amida, un éster o una sal de los mismos, así como a cualesquiera péptidos o polipéptidos específicamente enlistados en la presente, incluyendo, pero no limitándose a, los ejemplos experimentales.

Como se utiliza en la presente, la frase "secuencia de aminoácidos homóloga", o las variaciones de la misma, se refiere a las secuencias caracterizadas por una homología, al nivel de los aminoácidos, de cuando menos un porcentaje especificado, y se utiliza de una manera intercambiable con "identidad de secuencia". Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen las secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras y cuyos polipéptidos tienen el mismo enlace y/o la misma actividad. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos es homóloga si tiene cuando menos el 60 por ciento o

más, y hasta el 99 por ciento de identidad con una secuencia de comparación. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos es homóloga si comparte uno o más, y hasta 60 sustituciones, adiciones, o supresiones de aminoácidos con una secuencia de comparación. En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos homólogas tienen no más de 5 o no más de 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La homología también puede estar al nivel del polipéptido. El grado o el porcentaje de identidad de los péptidos o polipéptidos de la invención, o de porciones de los mismos, y diferentes secuencias de aminoácidos, se calcula como el número de emparejamientos exactos en una alineación de las dos secuencias, dividido entre la longitud de la “secuencia de la invención” o de la “secuencia extraña”, cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente el 80 al 99.9 por ciento, de preferencia del 90 al 99.9 por ciento con la secuencia de aminoácidos descrita en los ejemplos específicos, y que posee una estabilidad en plasma superior a la apelina-13 o a la pyr-1-apelina-13, cae bajo la categoría del polipéptido de la invención. En una modalidad, la mejora de la estabilidad en plasma es de cuando menos 2 veces. En una modalidad, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de cuando menos 30 minutos. En otra modalidad, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad

en plasma de cuando menos 60 minutos, de preferencia de cuando menos 100 minutos, y de una manera muy preferible de cuando menos 150 minutos.

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

Un polipéptido como se describe en la presente, o un equivalente sustancial del mismo, mediante la sustitución, supresión, adición o inserción de uno o más aminoácidos, se puede mencionar como los polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de la secuencia de aminoácidos en el sentido anterior. Un polipéptido como se describe en la presente, o un equivalente sustancial del mismo, mediante la sustitución de 1 a 5, de preferencia de 1 a 3, y de una manera muy preferible de 1 o 2 aminoácidos, con los aminoácidos naturales o innaturales, se puede mencionar como los polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de la secuencia de aminoácidos en el sentido anterior. Otras modificaciones y alteraciones pueden incluir el reemplazo de un L-aminoácido con un D-aminoácido, u otra variación, incluyendo, pero no limitándose a, fosforilación, carboxilación, alquilación, y similares, siempre que se mantenga la actividad agonista de apelina del péptido o polipéptido de las fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII o IX, y que se mejore la

estabilidad en plasma sobre la forma piroglutamatada de la apelina-13. Por ejemplo, los D-aminoácidos son bien tolerados con respecto a la actividad y estabilidad del polipéptido en la posición 2 (2 veces), en la posición 3 (3 veces), en las posiciones 5, 6, 7 y 8 (X5, X6, X7 y X8), en la posición 10 (X10), y en la posición 13 (X13) de los péptidos y polipéptidos cíclicos de las fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII o IX.

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

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y con ácidos orgánicos, por ejemplo, las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canfor-sulfonato, cloruro/clorhidrato, clorteofilonato, citrato, etan-disulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, lauril-sulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metil-sulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato ácido/fosfato diácido,

poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoro-acetato.

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

Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metan-sulfónico, ácido etan-sulfónico, ácido toluen-sulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con bases inorgánicas y orgánicas.

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

Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas que se presentan naturalmente, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio de iones, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen

isopropil-amina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietil-amina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto progenitor, una fracción básica o ácida, mediante los métodos químicos convencionales. En términos generales, estas sales se pueden preparar mediante la reacción de las formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, o bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o mediante la reacción de las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones típicamente se llevan a cabo en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En términos generales, es recomendable el uso de medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, cuando sea practicable. Las listas de las sales adecuadas adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, 20ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en “Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Como se utiliza en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservadores (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes anti-fúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de

absorción, sales, conservadores, fármacos, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, y similares, y combinaciones de los mismos, como serían conocidos por los expertos en este campo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto hasta donde cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un polipéptido de la presente invención se refiere a una cantidad del polipéptido de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la mitigación de un síntoma, el alivio de una condición, hacer más lento o retardar el progreso de la enfermedad, o la prevención de una enfermedad, etc. En una modalidad no limitante, el término “una cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del polipéptido de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es efectiva para: (1) cuando menos parcialmente aliviar, inhibir, impedir y/o mitigar una condición, un trastorno o una enfermedad o un síntoma de la misma (i) que sea mitigada mediante la activación del receptor de APJ, o (ii) asociada con la actividad del receptor de APJ, o (iii) caracterizada por una actividad anormal del receptor de APJ; o (2) activar el receptor de APJ.

En otra modalidad no limitante, el término “una cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del polipéptido de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o a un tejido, o a un material biológico no celular, o a un medio, es efectiva para cuando menos parcialmente activar el receptor de APJ. Como será apreciado por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo, la cantidad absoluta de un agente particular que sea efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el punto final biológico deseado, el agente que se vaya a suministrar, el tejido objetivo, etc. Aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo entienden que “una cantidad terapéuticamente efectiva” se puede administrar en una sola dosis o se puede lograr mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar insuficiencia cardíaca, una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para dar como resultado la mejora clínica del paciente, por ejemplo, una mayor tolerancia/capacidad al ejercicio, un aumento en la presión sanguínea, una disminución en la retención de fluidos, y/o mejores resultados en una prueba cuantitativa del funcionamiento cardíaco, por ejemplo, la fracción de expulsión, la capacidad de ejercicio (el tiempo hasta quedar exhausto), etc.

Como se utiliza en la presente, el término “sujeto” se refiere a un animal. Típicamente, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (por ejemplo, a seres humanos), reses, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas,

ratones, peces, aves y similares. En ciertas modalidades, el sujeto es un primate. En todavía otras modalidades, el sujeto es un ser humano.

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

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

Como se utilizan en la presente, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la

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

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

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

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

Los péptidos y polipéptidos de la presente invención se pueden producir mediante los procedimientos conocidos por sí mismos para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos

puede ser cualquiera de una síntesis en fase sólida y una síntesis en fase líquida. Por consiguiente, el péptido y polipéptido de interés se puede producir mediante la condensación de un péptido parcial o aminoácido capaz de constituir la proteína con la parte residual del mismo y, cuando el producto tiene un grupo protector, este grupo protector se desprende, sobre lo cual, se puede elaborar el péptido deseado. Los métodos conocidos para la condensación y la desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente literatura (1) a (5):

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

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

(3) Nobuo Izumiya y colaboradores, Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975,

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

(5) Haruaki Yajima (Editor), 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, tales como extracción con solvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos, y recristalización. Cuando el péptido aislado como anteriormente es un compuesto libre, se puede convertir hasta una sal adecuada mediante el método conocido.

Inversamente, cuando el producto aislado es una sal, se puede convertir hasta el péptido libre mediante el método conocido.

La amida del polipéptido se puede obtener mediante la utilización de una resina para la síntesis de péptidos, la cual es adecuada para la amidación. La resina incluye resina de cloro-metilo, resina de hidroxi-metilo, resina de benzhidril-amina, resina de amino-metilo, resina de alcohol 4-benciloxi-bencílico, resina de 4-metil-benzhidril-amina, resina de PAM, resina de 4-hidroxi-metil-metil-fenil-acetamido-metilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxi-fenil-hidroxi-metil)-fenoxilo, resina de 4-(2',4'-dimetoxi-fenil-Fmoc-amino-metil)-fenoxilo, resina de cloruro de 2-cloro-tritilo, etcétera. Utilizando esta resina, los aminoácidos cuyos grupos α-amino y grupos funcionales de cadena lateral se han protegido de una manera adecuada y se condensan sobre la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo mediante diversas técnicas de condensación que son conocidas por sí mismas. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se remueve de la resina y se remueven los grupos protectores y, si es necesario, se forman enlaces de disulfuro para obtener el polipéptido objetivo.

Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, se pueden utilizar una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, tales como HATU, HCTU, o, por ejemplo, una carbodi-imida. La carbodi-imida incluye DCC, N,N'-di-isopropil-carbodi-imida, y N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-carbodi-imida. Para la activación con dicho reactivo, se

puede utilizar un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, HOBt u Oxima Pura. El aminoácido protegido se puede agregar directamente a la resina junto con los reactivos de activación y el inhibidor de racemización, o se puede activar previamente como un anhídrido de ácido simétrico, éster de HOBt, o éster de HOOBt, y entonces se agrega a la resina. El solvente para la activación de los aminoácidos protegidos o para la condensación con la resina, se puede seleccionar apropiadamente de entre los solventes que son conocidos por ser útiles para las reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar N,N-dimetil-formamida, N-metil-pirrolidona, cloroformo, trifluoro-etanol, sulfóxido de dimetilo (DMSO), N,N-dimetil-formamida (DMF), piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo, acetato de etilo, o las mezclas adecuadas de los mismos.

La temperatura de la reacción se puede seleccionar a partir del intervalo conocido hasta ahora como útil para la formación del enlace peptídico, y es usualmente seleccionada a partir del intervalo de aproximadamente -20°C a 50°C. El derivado de aminoácido activado se utiliza en general en una proporción de un exceso de 1.5 a 4 veces. Si se encuentra que la condensación es insuficiente de acuerdo con una prueba que utilice la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin remover el grupo protector. Si una condensación repetida todavía fracasa para proporcionar un grado de condensación suficiente, el grupo sin reaccionar se puede acetilar

con anhídrido acético o con acetil-imidazol.

El grupo protector del grupo amino para aminoácido del el material de partida incluye Z, Boc, teramiloxi-carbonilo, isoborniloxi-carbonilo, 4-metoxi-benciloxi-carbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxi-carbonilo, trifluoro-acetilo, ftalilo, formilo, 2-nitro-fenil-sulfenilo, difenil-fosfino-tioílo, o Fmoc. El grupo protector de carboxilo que se puede utilizar incluye, pero no se limita a, los grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono y arilo de 6 a 10 átomos de carbono-alquilo de 1 a 2 átomos de carbono anteriormente mencionados, así como 2-adamantilo, 4-nitro-bencilo, 4-metoxi-bencilo, 4-cloro-bencilo, fenacilo, benciloxi-carbonil-hidrazido, terbutoxi-carbonil-hidrazido, y tritil-hidrazido.

El grupo hidroxilo de serina y treonina se puede proteger mediante una esterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha esterificación incluye los grupos derivados de carbono, tales como los grupos alcanoílo inferior, por ejemplo, acetilo etc., los grupos aroílo, por ejemplo, benzoílo etc., benciloxi-carbonilo, y etoxi-carbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación incluye bencilo, tetrahidro-piranilo, y terbutilo. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de tirosina incluye Bzl, Cl_2-Bzl, 2-nitro-bencilo, Br-Z, y terbutilo.

El grupo protector de imidazol para la histidina incluye Tos, 4-metoxi-2,3,6-trietil-bencen-sulfonilo, DNP, benciloxi-metilo, Bum, Boc, Trt, y Fmoc.

El grupo carboxilo activado del aminoácido de partida incluye

el anhídrido de ácido correspondiente, azida y los ésteres activos, por ejemplo, los ésteres con alcoholes, tales como pentacloro-fenol, 2,4,5-tricloro-fenol, 2,4-dinitro-fenol, alcohol ciano-metílico, p-nitro-fenol, HONB, N-hidroxi-succinimida, N-hidroxi-ftalimida, HOBt, etc. El grupo amino activado del aminoácido de partida incluye la fosforamida correspondiente.

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

presencia de 1,2-etanditiol o 1,4-butanditiol.

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

Otro método para obtener la forma de amida del polipéptido comprende amidar primeramente el grupo -carboxilo del aminoácido C-terminal, entonces extender la cadena del péptido hasta el lado N hasta la longitud deseada de la cadena, y luego desproteger selectivamente el grupo α-amino grupo del péptido C-terminal y el grupo α-carboxilo del aminoácido o péptido que vaya a formar el resto del polipéptido objetivo, y condensar los dos fragmentos cuyos grupo α-amino y grupos funcionales de cadena lateral se hayan protegido con los grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un solvente mixto, tal como aquél mencionado anteriormente en la presente. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser los mismos que se describen anteriormente en la presente. A partir del péptido protegido obtenido mediante condensación, se remueven todos los grupos protectores mediante el método anteriormente descrito, para proporcionar de esta manera el péptido crudo deseado. Este péptido crudo se puede purificar mediante los procedimientos de purificación conocidos, y la fracción principal se puede liofilizar para proporcionar el polipéptido amidado

objetivo. Con el fin de obtener un éster del polipéptido, el grupo α-carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para dar un éster de aminoácido y entonces, se sigue el procedimiento descrito anteriormente para la producción de la amida.

Los polipéptidos de la presente invención, o una amida, un éster o una sal de los mismos, se pueden administrar en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, intraperitonealmente, por inhalación, etc. En las modalidades particularmente preferidas de la invención se emplea la administración intravenosa continua de los polipéptidos de la presente invención, o de una amida, un éster, o una sal de los mismos. Los polipéptidos de la presente invención se pueden administrar como un bolo o como una infusión continua durante un período de tiempo. Se puede utilizar una bomba implantable. En ciertas modalidades de la invención, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se continúa durante uno a varios días (por ejemplo, 2 a 3 o más días), o durante períodos de tiempo más largos, por ejemplo, semanas, meses, o años. En algunas modalidades, se proporciona la administración intermitente o continua del polipéptido durante cuando menos aproximadamente 3 días. En otras modalidades, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se proporciona durante cuando menos aproximadamente una semana. En otras modalidades, la administración intermitente o continua de los polipéptidos se proporciona durante cuando menos

aproximadamente dos semanas. Puede ser recomendable mantener una concentración promedio del polipéptido en plasma por encima de un valor umbral particular, ya sea durante la administración o bien entre la administración de múltiples dosis. Una concentración recomendable se puede determinar, por ejemplo, basándose en la condición fisiológica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, etc. Estos valores recomendables se pueden identificar llevando a cabo estudios clínicos convencionales.

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

agentes humectantes, emulsionantes y reguladores del pH, etc.

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

Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.), o suero regulado con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en que se pueda pasar fácilmente por jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se deben conservar contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será

preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, poli-alcoholes, tales como manitol, aminoácidos, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Se puede provocar una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios convenientemente se preparan a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Estas composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservadores, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o reguladores del pH. En adición, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen de aproximadamente el 0.1 al 75 por ciento, o contienen de aproximadamente el 1 al 50 por ciento, del ingrediente activo.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con un ingrediente o con una combinación de ingredientes anteriormente enumerados, según se requieran, seguida por esterilización mediante filtración. En términos generales, las dispersiones se preparan mediante la incorporación

del compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de aquéllos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado por congelación, lo cual proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizarse.

Las composiciones orales en términos generales incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes, y se puede utilizar en la forma de tabletas, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para utilizarse como un enjuague bucal. Se pueden incluir agentes de enlace y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto, o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un derrapante, 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 el suministro oral pueden incorporar convenientemente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para la administración mediante inhalación, los agentes terapéuticos de la invención de preferencia se suministran en la forma de una aspersión en aerosol a partir de un recipiente o dosificador presurizado que contenga un propelente adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Se observa que los pulmones proporcionan una gran área superficial para el suministro sistémico de los agentes terapéuticos.

Los agentes se pueden encapsular, por ejemplo, en micropartículas poliméricas, tales como aquéllas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20040096403, o en asociación con cualquiera de una amplia variedad de otros vehículos de suministro de fármacos que son conocidos en la materia. En otras modalidades de la invención, los agentes se suministran en asociación con un lípido cargado como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20040062718. Se observa que este último sistema se ha utilizado para la administración de un polipéptido terapéutico, insulina, demostrando la utilidad de este sistema para la administración de agentes peptídicos.

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

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

Las composiciones adecuadas para su aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y a los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones rociables, por ejemplo, para su suministro mediante aerosol o similares. Estos sistemas de suministro tópico serán particularmente apropiados para la aplicación dérmica. Por consiguiente, son adecuados en particular para utilizarse en formulaciones tópicas, incluyendo cosméticas, bien conocidas en este campo. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes mejoradores de la tonicidad, reguladores, y conservadores.

Como se utiliza en la presente, una aplicación tópica también puede pertenecer a una inhalación o a una aplicación intranasal. Se pueden suministrar de una manera conveniente en la forma de un

polvo seco (ya sea solos, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, o bien como una partícula componente mezclada, por ejemplo, con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o de una presentación de aspersión en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la cual se descompondrá el compuesto de la presente invención, como un ingrediente activo. Estos agentes, los cuales son referidos en la presente como "estabilizantes", incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, reguladores del pH, o reguladores de sales, etc.

Método de la Invención:

La familia de péptidos de apelina es la única familia de ligandos naturales conocidos para el receptor de APJ acoplado con proteína-G. El gen de apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, el cual llega a procesarse hasta formas biológicamente activas de péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12, y la forma de apelina-13 modificada por piroglutamato (Pyr^{1}-apelina-13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, después de enlazarse al receptor de APJ, transduce la señal por medio de las proteínas Gi y Gq. En los cardiomiocitos, el acoplamiento de Gi o Gq conduce a cambios en el pH intracelular, en la activación de PLC, y en la producción de IP3

que mejora la sensibilidad al calcio de los miofilamentos, y por último dan como resultado un aumento en la contractilidad cardíaca. El acoplamiento de Gi inhibe la Gs activada, la ciclasa de adenililo, y la producción de cAMP, y aumenta los niveles de pAkt, lo cual conduce a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, con la activación de APJ por medio de Gi, la pAKT conduce a un aumento en la producción de óxido nítrico (NO), el cual aumenta la relajación del músculo liso, lo cual da como resultado una vasodilatación global.

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

En realidad, el tratamiento agudo con apelina (5 minutos) en los seres humanos, da como resultado vasodilatación coronaria y un mejor gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben un t½ muy corto (segundos), y una duración de acción muy corta (unos cuantos minutos) *in vivo*. Los potentes agonistas de péptidos de apelina sintéticos de la presente invención tienen vidas medias más largas comparándose con la apelina nativa.

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

Más recientemente, ha habido un número de publicaciones de investigación pre-clínica que se enfocan en el involucramiento potencial de la apelina en diabetes y resistencia a la insulina. Se ha demostrado que la apelina: 1) disminuye los niveles de glucosa en sangre mediante el mejoramiento de la absorción de glucosa en el músculo, en el tejido adiposo, y en el corazón, 2) protege a las células beta pancreáticas del estrés ER y la subsiguiente apoptosis,

3) disminuye la secreción de insulina en las células beta, y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en el tejido adiposo. La activación de la senda de pAKT se ha implicado en estos procesos.

Los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor de APJ, por ejemplo, como se indica en las pruebas *in vitro* e *in vivo* proporcionadas en las siguientes secciones y, por consiguiente, se indican para terapia.

Los polipéptidos de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada a partir de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

Por consiguiente, como una modalidad adicional, la presente

invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad que esté asociada con la actividad del receptor de APJ. En una modalidad adicional, la terapia se selecciona a partir de una enfermedad que responda al agonismo del receptor de APJ. En otra modalidad, la enfermedad se selecciona a partir de la lista anteriormente mencionada, de una manera adecuada insuficiencia cardíaca descompensada aguda. En todavía otro subconjunto de esta modalidad, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, éster o una sal del mismo, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que esté asociada con la actividad del receptor de APJ.

Por consiguiente, como una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en terapia. En una modalidad adicional, la terapia se selecciona a partir de una enfermedad que se pueda tratar mediante la activación (agonismo) del receptor de APJ.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad que responda al agonismo del receptor de APJ, el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo. En una modalidad adicional, la enfermedad se selecciona a partir de

la lista anteriormente mencionada, de una manera adecuada insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

En todavía otro subconjunto de esta modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad que esté asociada con la actividad del receptor de APJ, el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

La cantidad efectiva de una composición o combinación farmacéutica de la invención que se deba emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, por consiguiente, variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la cual se esté utilizando la variante de proteína de fusión, de la vía de administración, y del tamaño (peso corporal, superficie corporal, o tamaño del órgano) y la condición (la edad y la salud general) del paciente. De conformidad con lo anterior, el clínico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.1 microgramo/kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras modalidades, la dosificación puede estar en el intervalo de 0.1 microgramo/kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo; o de 1 microgramo/

kilogramo a aproximadamente 100 miligramos/kilogramo.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de doble función en la formulación que se esté utilizando. Típicamente, un clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. La composición, por consiguiente, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (las cuales pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua por medio de un dispositivo de implantación o de un catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada es hecho rutinariamente por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo, y está dentro del ámbito de las tareas que son rutinariamente realizadas por ellos. Las dosificaciones apropiadas pueden ser aseveradas a través del uso de los datos de respuesta a la dosis apropiados.

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

Ensayo de flujo de calcio de hAPJ:

Las células Chem-5 APJ estables (Millipore # HTS068C) se emplacaron en un formato de 384 pozos con 10,000 células/pozo en 25 microlitros de medio de crecimiento, entonces se hicieron crecer durante 24 horas en una incubadora de cultivo de tejido a 37°C. Una hora antes el ensayo, se agregaron 25 microlitros/pozo de tinte de Calcio 4 FLIPR (Molecular Devices R8142) con probenecid 2.5 mM, y

las células se incubaron durante una hora en una incubadora de cultivo de tejido a 37°C. Los péptidos se solubilizaron en regulador de HBSS, HEPES, y albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1 por ciento, y se diluyeron en serie 10 veces, desde 50 µM hasta 5 pM, por triplicado. Se utilizó FLIPR Tetra para agregar el péptido a las células con el tinte (1:5, para concentraciones del péptido final en el intervalo de 10 µM a 1 pM). El tinte FLIPR dentro de las células emitió fluorescencia después del enlace con calcio, mientras que la fluorescencia a partir de las células externas fue enmascarada. La fluorescencia se midió utilizando longitudes de onda de excitación de 470 a 495 y de emisión de 515 a 575 en el FLIPR Tetra. Las lecturas se hicieron durante 3 minutos en total, empezando 10 segundos antes de la adición del péptido. Se calcularon los valores máximo-mínimo, y se graficaron para cada concentración de péptido, y se utilizó el software GraphPad Prism para calcular los valores EC_{50} en los puntos de inflexión de la curva, para determinar la estimulación del flujo de calcio por parte de los péptidos.

Ensayo de estabilidad en plasma:

Materiales:

Solución de procesamiento: Se prepara 1 miligramo/mililitro del artículo de prueba en agua Milli-Q.

Solución de extracción: Metanol:Acetonitrilo:Agua (1:1:1) con ácido fórmico al 0.1 por ciento y 400 nanogramos/mililitro de Gliburida.

Plasma: Plasma de rata Sprague-Dawley macho (con heparina

de sodio), adquirido en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY).

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

Homogenato de pulmón: El pulmón de rata Sprague Dawley macho se adquirió en Bioreclamation LLC (Liverpool, NY). El pulmón se homogeneizó utilizando un homogeneizador Polytron después de la adición de 5 veces el volumen de suero regulado con fosfato (PBS) 1X. El homogenato se centrifugó a 9,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos para hacer un sobrenadante transparente. La concentración de proteína se determinó utilizando un kit comercial (Pierce, Thermo Scientific).

Procedimiento de preparación de muestras:

El artículo de prueba se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: plasma de rata heparinizado, sangre entera de rata heparinizada, u homogenato de pulmón. La muestra de plasma y sangre entera se preparó a 5,000 nanogramos/mililitro mediante la adición de 5 microlitros de una solución de procesamiento de 1 miligramo/mililitro a 995 microlitros de plasma de rata o sangre entera. Las muestras de homogenato de pulmón se prepararon mediante la dilución del homogenato de pulmón en una concentración de 1 miligramo/mililitro de proteína con suero regulado con fosfato (PBS), seguida por la adición de 5 microlitros de la

solución de procesamiento a 995 microlitros de homogenato de pulmón diluido. Las muestras se incubaron a 37°C con agitación suave (de aproximadamente 65 a 75 revoluciones por minuto (rpm)) en una incubadora con un baño de agua. En los tiempos de 0 minutos, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 y 240 minutos, se transfirieron alícuotas de 25 microlitros de muestras de incubación a la placa de 96 pozos, e inmediatamente se precipitó la proteína utilizando 150 microlitros de la solución de extracción. Después de completarse el experimento de incubación, la placa de muestras se centrifugó a 4,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C durante 10 minutos. Después, se utilizó un dispositivo pipeteador (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y agregar 50 microlitros de agua a todas las muestras. La placa se puso en vórtex antes del análisis de LC-MS.

LC-MS Análisis de estabilidad de muestras.

HPLC: Agilent 1290 HPLC con automuestreador.

Columna: MAC-MOD ACE C18, 3 micras, 30 milímetros x 2.1 milímetros de diámetro interno.

Fase móvil A: Ácido fórmico al 0.1 por ciento en acetonitrilo.

Fase móvil B: Ácido fórmico al 0.1 por ciento en agua.

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

Espectrómetro de masas: Agilent Q-TOF 6530.

Modo de adquisición de datos: Barrido completo con intervalo de masas de 100 a 1,000 m/z.

Software de adquisición y análisis de datos: MassHunter.

Análisis de datos:

Ensayo de estabilidad: Estabilidad vida media, (t ½), los valores se determinaron mediante la conversión de las áreas pico en cada punto del tiempo hasta el porcentaje en relación con el área pico inicial (t = 0).

Porcentaje restante = 100 x (área pico de muestra) ÷ (t = 0 área pico).

El log natural de los valores de porcentaje restante se calculó y se graficó contra el tiempo de muestreo (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó mediante regresión lineal (Microsoft Excel).

Entonces se calculó la estabilidad de la vida media mediante la fórmula, t ½ = 0.693 ÷ k.

Ensayo de estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada:

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 por ciento (Bioreclamation # RATPLNAHP-M,

tratado con heparina de sodio). Se tomaron lecturas en los puntos del tiempo t_0 y t_{24} horas, después de la incubación en una incubadora de cultivo de tejido a 37°C. Se estimó la vida media en plasma del péptido mediante el cálculo de los siguientes:

1) LN((EC_{50} en t_0) / (EC_{50} en $t_{24\ horas}$)),

2) Calcular la pendiente del valor anterior, y

3) $t_{1/2}$ = 0.693/(pendiente^2).

Utilizando la prueba ensayo (como se describe anteriormente) los polipéptidos de la invención exhibieron eficacia y estabilidad de acuerdo con las Tablas 2 y 3, proporcionadas a continuación.

Tabla 2

Actividad y Estabilidad de Polipéptidos

Péptido	**hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]**	**Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]**
Ejemplo 1	90.13	30.7
Ejemplo 2	132.58	27.1
Ejemplo 3	1008.19	98.0
Ejemplo 4	746.74	50.0
Ejemplo 5	21.25	126.2
Ejemplo 6	21.98	117.2
Ejemplo 7	90.85	>1000

Péptido	hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 8	1.04	407
Ejemplo 9	2.16	>1000
Ejemplo 10	2.54	>1000
Ejemplo 11	3.52	>1000
Ejemplo 12	2.07	93.6
Ejemplo 13	2.26	283.6
Ejemplo 14	8.83	85.2
Ejemplo 15	3.53	180.3
Ejemplo 16	1.43	13.4
Ejemplo 17	3.29	14.1
Ejemplo 18	1.62	248.1
Ejemplo 19	8.46	28.4
Ejemplo 20	173.24	490.4
Ejemplo 21	75.81	639.7
Ejemplo 22	42.03	799.9

Péptido	hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 23	52.42	>1000
Ejemplo 24	32.65	303.5
Ejemplo 25	24.50	>1000
Ejemplo 26	29.84	>1000
Ejemplo 27	65.55	>1000
Ejemplo 28	5.68	440.3
Ejemplo 29	4.33	216.6
Ejemplo 30	6.05	>1000
Ejemplo 31	84.11	>1000
Ejemplo 32	518.08	>1000
Ejemplo 33	8.10	>1000
Ejemplo 34	3.21	505.2
Ejemplo 35	11.12	>1000
Ejemplo 36	7.36	>1000
Ejemplo 37	1.40	164.3

Péptido	hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 38	181.77	>1000
Ejemplo 39	8.20	654.9
Ejemplo 40	7.99	>1000
Ejemplo 41	6.91	627.1
Ejemplo 42	92.77	>1000
Ejemplo 43	4.14	>1000
Ejemplo 44	5.94	855.8
Ejemplo 45	6.55	167.3
Ejemplo 46	3.87	502.1
Ejemplo 47	2.41	418.9
Ejemplo 48	4.10	546.4
Ejemplo 49	34.19	>1000
Ejemplo 50	1.92	>1000
Ejemplo 51	1.09	655.9
Ejemplo 52	53.88	777.8

Péptido	hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 53	1.07	>1000
Ejemplo 54	6.70	>1000
Ejemplo 55	8.16	>1000
Ejemplo 56	1.12	>1000
Ejemplo 57	2.01	>1000
Ejemplo 58	13.09	>1000
Ejemplo 59	10.00	>1000
Ejemplo 60	8.15	>1000
Ejemplo 61	89.15	259.9
Ejemplo 62	3.32	>1000
Ejemplo 63	3.18	703.9
Ejemplo 64	6.3	455
Ejemplo 65	1.1	596
Ejemplo 66	589	596

Péptido	hAPJ Flujo de Ca^{2+} EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma basada en actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo comparativo: Pyr1-apelina-13	1.79	5.0

Tabla 3

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

Péptido	Estabilidad en plasma t½ [min]	Estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 8	163	407
Ejemplo 12	53.9	96.16
Ejemplo 13	183	283.6
Ejemplo 14	63	85.2
Ejemplo 16	10.2	13.4
Ejemplo 17	2.3	14.1

Péptido	Estabilidad en plasma t½ [min]	Estabilidad en plasma basada en la actividad subrogada t½ [min]
Ejemplo 18	220	248.1
Pyr-1-Apelina 13	6.6	5.0

El polipéptido de la presente invención puede tener una potencia del receptor de APJ similar a aquélla de la apelina-13 o pyr-1-apelina-13. En una modalidad, el polipéptido de la presente invención tiene una EC_{50} de menos de 100 nM. En otra modalidad, el polipéptido de la invención tiene una EC_{50} de menos de 50 nM, de preferencia de menos de 25 nM, y de una manera muy preferible de menos de 15 nM. En todavía otra modalidad, el polipéptido de la presente invención tiene una EC_{50} de menos de 10 nM.

El polipéptido de la presente invención puede tener una estabilidad en plasma superior a aquélla de la apelina-13 o pyr-1-apelina-13. En una modalidad, la mejora en la estabilidad en plasma es de cuando menos 2 veces. En una modalidad, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de cuando menos 30 minutos. En otra modalidad, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad en plasma de cuando menos 10 minutos, de cuando menos 40 minutos, y de una manera muy preferible de cuando menos

60 minutos.

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

En una modalidad, la invención proporciona un producto que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, y cuando menos otro agente terapéutico, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, en terapia. En una modalidad, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición que responda a la activación del receptor de APJ.

Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, y los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, y los otros agentes terapéuticos en una forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, y otros

agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente.

En una modalidad, la invención proporciona un kit, el cual comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, cuando menos una de las cuales contiene un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I' y I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo. En una modalidad, el kit comprende elementos para contener por separado estas composiciones, tales como un recipiente, un frasco dividido, o un paquete de lámina dividido. Un ejemplo de este kit es un paquete de burbujas, como se utiliza típicamente para el empaque de tabletas, cápsulas y similares.

El kit de la invención se puede utilizar para administrar formas de dosificación diferentes, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas una contra la otra. Para ayudar al cumplimiento, el kit de la invención típicamente comprende instrucciones para la administración.

En las terapias de combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico pueden ser elaborados y/o formulados por el mismo o por diferentes fabricantes. Más aún, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico, se pueden reunir en una terapia de combinación: (i) antes de liberar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo, en el caso de un kit que comprenda el compuesto de la invención y el otro agente

terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la guía del médico) poco antes de la administración; (iii) en los pacientes mismos, por ejemplo, durante la administración en secuencia de un polipéptido de la invención y el otro agente terapéutico.

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el medicamento se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de apelina, en donde el medicamento se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico

se prepara para su administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o con una amida, un éster o una sal del mismo. La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

La invención también proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o condición que responda al agonismo del receptor de APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX, o con una amida, un éster o una sal del mismo.

En una modalidad, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de inótropos, bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueadores del canal de calcio (CCB), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de los receptores de aldosterona, bloqueadores de los receptores de endotelina, inhibidores de la sintasa de aldosterona (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida), y un inhibidor de NEP.

El término “en combinación con” un segundo agente o tratamiento incluye la co-administración del polipéptido de la invención (por ejemplo, un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o un polipéptido descrito de otra manera en la presente) con el segundo agente o tratamiento; primeramente la administración del compuesto de la invención, seguido por el segundo agente o tratamiento, y primeramente la administración del segundo agente o tratamiento, seguido por el compuesto de la invención.

El término “segundo agente” incluye cualquier agente que sea conocido en la materia para tratar, prevenir, o reducir los síntomas de una enfermedad o de un trastorno descrito en la presente, por ejemplo, un trastorno o enfermedad que responda a la activación del

receptor de APJ, tal como, por ejemplo, insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

Los ejemplos de los segundos agentes incluyen inótropos, bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueadores del canal de calcio (CCB), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de los receptores de aldosterona, bloqueadores de los receptores de endotelina, inhibidores de la sintasa de aldosterona (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y/o un inhibidor de NEP.

Inótropos, como se utilizan en la presente, incluyen, por ejemplo, dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendan, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol y digoxina.

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

Anti-coagulantes, como se utilizan en la presente, incluyen Dalteparina, Danaparoid, Enoxaparina, Heparina, Tinzaparina, Warfarina.

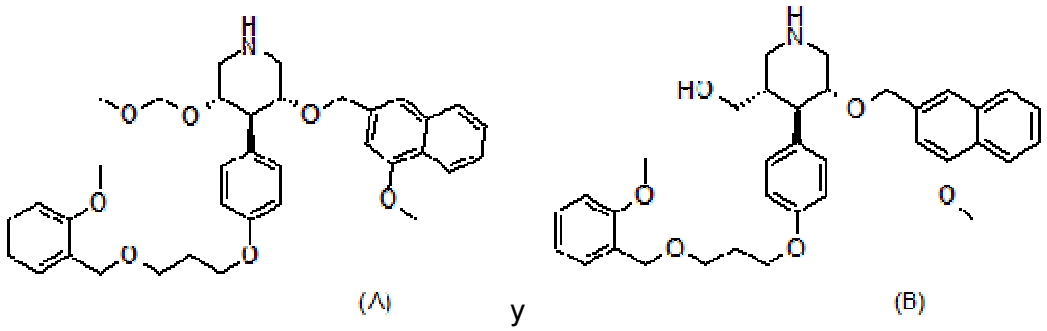
El término “inhibidor de HMG-Co-A-reductasa” (también denominados como inhibidores de beta-hidroxi-beta-metil-glutaril-co-enzima-A-reductasa) incluye los agentes activos que se pueden utilizar para disminuir los niveles de lípidos, incluyendo el colesterol en sangre. Los ejemplos incluyen atorvastatina,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

El término “inhibidor de ACE” (también denominados como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) incluye las moléculas que interrumpen la degradación enzimática de la angiotensina I hasta la angiotensina II. Estos compuestos se pueden utilizar para la regulación de la presión sanguínea y para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. Los ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilato, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilato, fosinopril, imidapril,

lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, y trandolapril, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “antagonista de endotelina” incluye bosentan (véase la Patente Europea Número EP 526708 A), tezosentan (véase la Publicación Internacional Número WO 96/19459), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

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



(A) y (B)

o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

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

El término “un bloqueador del canal de calcio (CCB)” incluye dihidro-piridinas (DHPs), y no-dihidro-piridinas (no-DHPs) (por ejemplo, los bloqueadores del canal de calcio (CCBs) tipo diltiazem y tipo verapamil). Los ejemplos incluyen amlodipina, Bepridil, Diltiazem, felodipina, riosidina, isradipina, lacidipina, nicardipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, Verapamil y nivaldipina, y es de preferencia un representante de no-dihidro-piridina (no-DHP) seleccionado a partir del grupo que consiste en flunarizina, prenilamina, diltiazem, fendilina, galopamil, mibefradil, anipamil, tiapamil y verapamil, o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los bloqueadores del canal de calcio (CCBs) se pueden utilizar como fármacos anti-hipertensivos, anti-angina de pecho, o anti-arrítmicos.

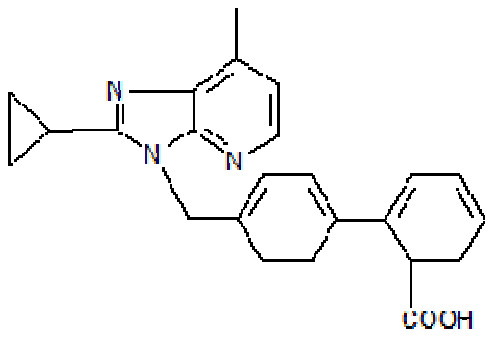
El término “diurético” incluye derivados de tiazida (por ejemplo,

clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida, y clorotalidona).

El término “mimético de ApoA-I” incluye los péptidos D4F (por ejemplo, de la fórmula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F) (SEQ ID NO: 7).

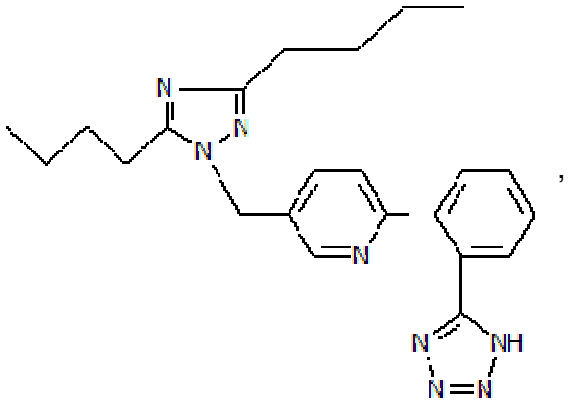
Se entiende que un antagonista del receptor de angiotensina II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un ingrediente activo que se enlaza con el subtipo de receptor AT_1 del receptor de angiotensina II, pero que no da como resultado la activación del receptor. Como una consecuencia de la inhibición del receptor AT_1, estos antagonistas se pueden emplear, por ejemplo, como antihipertensivos, o para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva.

La clase de antagonistas del receptor AT_1 comprende los compuestos que tienen diferentes características estructurales, y se prefieren esencialmente los no peptídicos. Por ejemplo, se puede hacer mención de los compuestos que se seleccionan a partir del grupo que consiste en valsartan, losartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, saprisartan, tasosartan, telmisartan, el compuesto con la designación E-1477 de la siguiente fórmula:

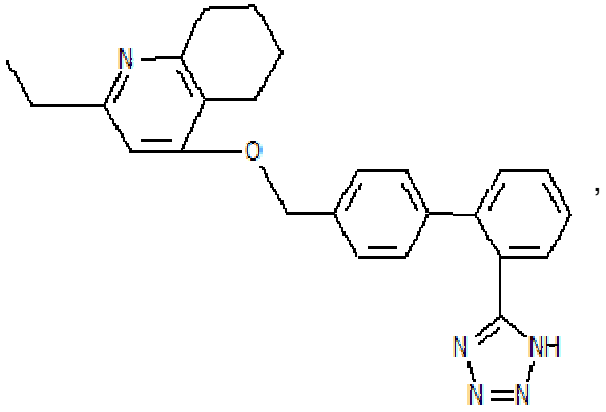


,

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



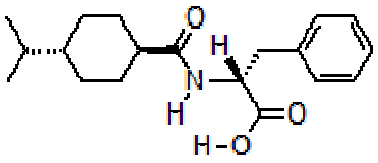
y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula:



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

Los antagonistas del receptor AT_1 preferidos son candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan, valsartan. También se prefieren los agentes que han sido comercializados, más preferiblemente valsartan, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término “agente anti-diabético” incluye la secreción de potenciadores de insulina que promuevan la secreción de insulina a partir de las células-ß pancreáticas. Los ejemplos incluyen derivados de biguanida (por ejemplo, metformina), sulfonilureas (SU) (por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-cloro-*N*-[(1-pirrolidinil-amino)-carbonil]-benzensulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepida, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida, y tolil-ciclamida), o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otros ejemplos incluyen los derivados de fenilalanina (por ejemplo, nateglinida [*N*-(*trans*-4-isopropil-ciclohexil-carbonil)-*D*-fenilalanina] (véanse las Patentes Europeas Números EP 196222 y EP 526171) de la fórmula:



;

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

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

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

El inhibidor de DPP-IV (dipeptidil-peptidasa IV) puede ser peptídico o, de preferencia, no peptídico. Los inhibidores de DPP-IV se dan a conocer en cada caso genéricamente y específicamente, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, y en las Publicaciones Internacionales Números WO 00/34241 y WO 95/15309, en cada caso en particular en las reivindicaciones del compuesto, y los productos finales de los ejemplos de procesamiento, el asunto objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan a la presente solicitud por referencia a estas publicaciones. Se prefieren los compuestos que se dan a conocer específicamente en el Ejemplo 3 de la Publicación Internacional Número WO 98/19998 y en el Ejemplo 1 de la Publicación Internacional Número WO 00/34241, respectivamente.

GLP-1 (péptido tipo glucagon-1) es una proteína insulinotrópica que es descrita, por ejemplo, por W.E. Schmidt y colaboradores, en

Diabetologia, 28, 1985, 704-707, y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,705,483.

El término “agonistas de GLP-1” incluye las variantes y los análogos de GLP-1(7-36)NH_2 que se dan a conocer en particular en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 5,120,712, US 5,118666, US 5,512,549, en la Publicación Internacional Número WO 91/11457, y por C. Orskov y colaboradores en J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826. Otros ejemplos incluyen GLP-1(7-37), en cuyo compuesto, la funcionalidad de amida carboxi-terminal de Arg^{36} es desplazada con Gly en la 37ª posición de la molécula de GLP-1(7-36)NH_2, y las variantes y los análogos del mismo, incluyendo GLN^9-GLP-1(7-37), D-GLN^9-GLP-1(7-37), acetilo LYS^9-GLP-1(7-37), LYS^{18}-GLP-1(7-37) y, en particular, GLP-1(7-37)OH, VAL^8-GLP-1(7-37), GLY^8-GLP-1(7-37), THR^8-GLP-1(7-37), MET^8-GLP-1(7-37), y 4-imidazopropionil-GLP-1. También se da una preferencia especial al análogo de agonista de GLP exendina-4, descrito por Greig y colaboradores, en *Diabetologia* 1999, 42, 45-50.

También se incluye en la definición de “agente anti-diabético”, la sensibilidad a los potenciadores de insulina que restablecen la función deteriorada de los receptores de insulina para reducir la resistencia a la insulina y, en consecuencia, para mejorar la sensibilidad a la insulina. Los ejemplos incluyen los derivados hipoglicémicos de tiazolidinadiona (por ejemplo, glitazona, (*S*)((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2H-1-benzopiran-6-il)-metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-{[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxo-propil)-

fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (darglitazona), 5-{[4-(1-metil-ciclohexil)-metoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (ciglitazona), 5-{[4-(2-(1-indolil)-etoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (DRF2189), 5-{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-etoxi)]-bencil}-tiazolidina-2,4-diona (BM-13.1246), 5-(2-naftil-sulfonil)-tiazolidina-2,4-diona (AY-31637), bis-{4-[(2,4-dioxo-5-tiazolidinil)-metil]-fenil}-metano (YM268), 5-{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-2-hidroxi-etoxi]-bencil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-[4-(1-fenil-1-ciclopropan-carbonil-amino)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-dihidro-indol-1-il)-etoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil])-2-propinil]-5-fenil-sulfonil)-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil])-2-propinil]-5-(4-fluoro-fenil-sulfonil)-tiazolidina-2,4-diona, 5-{[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (rosiglitazona), 5-{[4-(2-(5-etil-2-piridil)-etoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (pioglitazona), 5-{[4-((3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopiran-2-il)-metoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-[6-(2-fluoro-benciloxi)-naftalen-2-il-metil]-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-{[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (T-174), y 5-(2,4-dioxo-tiazolidin-5-il-metil)-2-metoxi-N-(4-trifluoro-metil-bencil)-benzamida (KRP297)).

Otros agentes anti-diabéticos incluyen, moduladores de la senda de señalización de insulina, como los inhibidores de fosfatasas de proteína tirosina (PTPasas), compuestos miméticos de molécula no pequeña anti-diabéticos e inhibidores de amido-transferasa de glutamina-fructosa-6-fosfato (GFAT); compuestos que

tienen influencia sobre la producción de glucosa hepática mal regulada, como inhibidores de glucosa-6-fosfatasa (G6Pase), inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-Bpasa), inhibidores de fosforilasa de glicógeno (GP), antagonistas del receptor de glucagon e inhibidores de carboxicinasa de fosfoenolpiruvato (PEPCK); inhibidores de cinasa de deshidrogenasa de piruvato (PDHK); inhibidores del vaciado gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor de retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de las proteínas de desacoplamiento (UCPs); agonistas de PPARγ no de tipo glitazona; agonistas dobles de PPARα□/PPARγ; compuestos anti-diabéticos que contienen vanadio; hormonas de incretina, como péptido tipo glucagon-1 (GLP-1), y agonistas de GLP-1; antagonistas de los receptores de imidazolina de células-beta; miglitol; antagonistas α_2-adrenérgicos; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una modalidad, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, la cual comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados a partir de bloqueadores del receptor ß-adrenérgico, tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas de los receptores de angiotensina II tales como bloqueadores de AT1; agentes anti-diabéticos, tales como inhibidor de DPPIVs (por

ejemplo, vildagliptina), y agonista del péptido GLP1.

El término “agente reductor de la obesidad” incluye inhibidores de lipasa (por ejemplo, orlistato), y supresores del apetito (por ejemplo, sibutramina y fentermina).

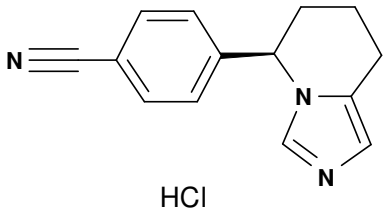
Se entiende que un inhibidor de la sintasa de aldosterona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un ingrediente activo que tiene la propiedad para inhibir la producción de aldosterona. La sintasa de aldosterona (CYP11B2) es una enzima del citocromo mitocondrial P450 que cataliza el último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

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

Se da preferencia a los inhibidores de la sintasa de aldosterona comercialmente disponibles o a los inhibidores de la sintasa de aldosterona que han sido aprobados por las autoridades

de salud.

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



.

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

Los inhibidores de la sintasa de aldosterona útiles en combinación son los compuestos y análogos genéricamente y específicamente dados a conocer, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones del compuesto, y los productos finales de los ejemplos de procesamiento, el asunto objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan a la presente solicitud por referencia a esta publicación. Los inhibidores de la sintasa de aldosterona adecuados preferidos para utilizarse en la presente invención incluyen, sin limitación, 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-3-metil-benzonitrilo; (4-metoxi-bencil)-metil-amida del ácido 5-(2-

cloro-4-ciano-fenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-carboxílico; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo-[1,5-*a*]-azepin-5-il)-bifenil-3-carbonitrilo; butil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-c]-imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-2-metoxi-benzonitrilo; 4-fluoro-bencil-éster del ácido 5-(2-cloro-4-ciano-fenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-carboxílico; metil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-trifluoro-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-c]-imidazol-5-carboxílico; 2-isopropoxi-etil-éster del ácido 5-(4-ciano-2-metoxi-fenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-2-metil-benzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-3-fluoro-benzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-2-metoxi-benzonitrilo; 3-fluoro-4-(7-metilen-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo-[1,2-*c*]-imidazol-5-il)-benzonitrilo; *cis*-3-fluoro-4-[7-(4-fluoro-bencil)-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo-[1,5-a]-piridin-5-il]-benzonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo-[1,5-*a*]-azepin-5-il)-bifenil-3-carbonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo-[1,5-*a*]-azepin-5-il)-bifenil-3-carbonitrilo o, en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El término inhibidores de la sintasa de aldosterona también incluye los compuestos y análogos que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO2008/076860, WO2008/076336, WO2008/076862, WO2008/027284, WO2004/046145,

WO2004/014914, y WO2001/076574.

Adicionalmente, los inhibidores de la sintasa de aldosterona también incluyen los compuestos y análogos que se dan a conocer en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 y en las Solicitudes Internacionales del TCP Números WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744, y en la Solicitud de Patente Europea Número EP 1886695. Los inhibidores de la sintasa de aldosterona adecuados preferidos para utilizarse en la presente invención incluyen, sin limitación, 8-(4-fluoro-fenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazina; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-2-fluoro-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-2,6-difluoro-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-2-metoxi-benzonitrilo; 3-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-ftalonitrilo; 4-(8-(4-ciano-fenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazin-8-il)-naftalen-1-carbonitrilo; 8-[4-(1*H*-tetrazol-5-il)-fenil1-5,6-dihidro-8*H*-imidazo-[5,1-c][1,4]-oxazina, como son desarrollados por Speedel o, en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los inhibidores de la sintasa de aldosterona útiles en la combinación son los compuestos y análogos genéricamente y específicamente dados a conocer, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO 2009/156462 y WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones del compuesto, y los productos finales de los ejemplos de procesamiento, el asunto objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan como referencia. Los inhibidores de la sintasa de aldosterona adecuados preferidos para la combinación de la presente invención incluyen: clorhidrato de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol-1-il-metil)-benzonitrilo, 1-(4-metan-sulfonil-bencil)-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol, 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1H-indol, etil-éster del ácido 5-(3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-nicotínico, *N*-[5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-etan-sulfonamida, 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-éster del ácido pirrolidin-1-sulfónico, *N*-metil-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-metan-sulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(2-pirrolidin-1-il-etil-amino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metan-sulfonil-piperazin-1-il-metil)-piridin-3-il]-1-metil-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(1-metil-piperidin-4-il-amino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-amida del ácido morfolin-4-carboxílico, *N*-[5-(6-cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-etan-sulfonamida, *C,C,C*-trifluoro-N-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il-metil]-metan-sulfonamida, N-[5-

(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluoro-metil-bencen-sulfonamida, N-[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metan-sulfonamida, N-(5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il)-butan-1-sulfonamida, N-(1-(5-(4-ciano-3-metoxi-fenil)-piridin-3-il)-etil)-etan-sulfonamida, N-((5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il)(ciclopropil)-metil)-etan-sulfonamida, N-(ciclopropil-(5-(1*H*-indol-5-il)-piridin-3-il)-metil)-etan-sulfonamida, N-(ciclopropil-(5-naftalen-1-il-piridin-3-il)-metil)-etan-sulfonamida, [5-(6-cloro-1-metil-1H-pirrolo-[2,3-b]-piridin-2-il)-piridin-3-il-metil]-amida del ácido etan-sulfónico, y {[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil}-etil-amida del ácido etan-sulfónico.

El término “bloqueador de los receptores de endotelina” incluye bosentan y ambrisentan.

El término “inhibidor de CETP” se refiere a un compuesto que inhibe el transporte mediado por la proteína de transferencia de colesteril-éster (CETP) de diversos colesteril-ésteres y triglicéridos desde HDL hasta LDL y VLDL. Esta actividad de inhibición de la proteína de transferencia de colesteril-éster (CETP) realmente es determinada por los expertos en la materia de acuerdo con los ensayos convencionales (por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,140,343). Los ejemplos incluyen los compuestos que se dan a conocer en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 6,140,343 y 6,197,786 (por ejemplo, el etil-éster del ácido [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluoro-metil-bencil)-metoxi-carbonil-amino]-2-etil-6-trifluoro-metil-3,4-dihidro-2H-

quinolin-1-carboxílico (torcetrapib); los compuestos que se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 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); los compuestos que se dan a conocer en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica con Número de Serie 10/807,838; los derivados de polipéptidos que se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,512,548; los derivados de rosenonolactona y los análogos de colesteril-éster que contienen fosfato que se dan a conocer en *J. Antibiot.,* 49(8): 815- 816 (1996), y *Bioorg. Med. Chem. Lett.;* 6: 1951-1954 (1996), respectivamente. Adicionalmente, los inhibidores de la proteína de transferencia de colesteril-éster (CETP) también incluyen aquéllos que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, y en las Publicaciones Internacionales Números WO 2007/128568, WO2008/009435, WO 2009/059943 y WO2009/071509.

El término “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, Sampatrilato, Fasidotril, Omapatrilato, Gemopatrilato, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37, y el etil-éster del ácido (2R,4S)-5-bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionil-amino)-2-metil-pentanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP)

también incluyen los derivados dipeptídicos sustituidos por fosfono/ biarilo, como se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,155,100. Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen al derivado de N-mercaptoacil-fenilalanina, como se da a conocer en la Solicitud Internacional del TCP Número WO 2003/104200.

Los inhibidores de la endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen agentes de doble acción contra la hipertensión, como se dan a conocer en las Solicitudes Internacionales del TCP Números WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen los compuestos que se dan a conocer en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 12/788,794; 12/788,766 y 12/947,029. Los inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP) también incluyen los compuestos que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271, y en las Solicitudes Provisionales de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 61/414171 y 61/414163.

En una modalidad, la invención proporciona un método para activar el receptor de APJ en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la

activación del receptor de APJ, en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo.

En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación (agonismo) del receptor de APJ, en un sujeto, en donde el trastorno o la enfermedad se selecciona a partir de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

En una modalidad, la invención proporciona un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, para utilizarse como un medicamento.

En una modalidad, la invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o

de una enfermedad que responda a la activación del receptor de APJ. En otra modalidad, la invención proporciona el uso de un polipéptido de acuerdo con la definición de cualquiera de las fórmulas I a IX, o de una amida, un éster o una sal del mismo, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o de una enfermedad que responda a la activación del receptor de APJ, en donde este trastorno o enfermedad se selecciona en particular a partir de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

Ejemplificación de la invención:

Síntesis de péptidos y polipéptidos:

Abreviatura	**Definición**
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo

Abreviatura	Definición
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ac_2O	Anhídrido acético
AM	Amino-metilo
BAL	Enlazador de amida de la estructura base
BSA	Albúmina de suero bovino
Boc	terbutiloxi-carbonilo
DCM	Dicloro-metano
DIC	*N,N'*-di-isopropil-carbodi-imida
DIPEA	*N,N*'-di-isopropil-etil-amina
DMA	*N,N*'-dimetil-acetamida
DMF	*N,N'*-dimetil-formamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DVB	Divinil-benceno
EDT	Etanditiol
FA	Ácido fórmico

Abreviatura	Definición
Fmoc	9-Fluorenil-metiloxi-carbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
HBSS	Solución de sal regulada de Hank
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzo-triazol-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etan-sulfónico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
ivDde	(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciclohex-1-iliden)-3-metil-butilo
LN	*Logarithmus naturali* (logaritmo natural)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
Nal	2-Naftilalanina

Abreviatura	Definición
Nle	Norleucina
NMP	N-metil-pirrolidina
Oxima Pura	2-ciano-2-(hidroxi-imino)-acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametil-dihidro-benzo-furan-5-sulfonilo
*p*E	Piroglutamato
PG	Grupo protector
Ph	Fenilo
PS	Poliestireno
POL	Soporte de polímero
rt	Temperatura ambiente
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
*t*BuOH	Terbutanol
TFA	Ácido trifluoro-acético
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Tri-isopropil-silano

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

Los péptidos se sintetizaron mediante la química Fmoc en fase sólida convencional. Los péptidos se ensamblaron en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR} (Protein Technologies, Inc., Tucson, EUA). Los péptidos con un ácido carboxílico libre sobre el término C se sintetizaron a partir de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo-PS (ABCR, Karlsruhe, Alemania). Los péptidos con una carboxamida insustituida sobre el término C se sintetizaron a partir de la resina Rink-Amida-AM-PS protegida por Fmoc (Merck, Darmstadt, Alemania). Los péptidos con una carboxamida N-mono-sustituida sobre el término C se sintetizaron a partir de la resina BAL-AM-PS cargada con aminas (EMC Microcollections, Tübingen, Alemania).

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

- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 micras, 30 x 100 milímetros, Parte No. 186002572 (una columna o dos columnas

en serie).

- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 micras, 30 x 150 milímetros, Parte No. 186002797.
- Columna Waters Atlantis Prep OBD T3, 5 micras, 30 x 150 milímetros, Parte No.186003703.
- Columna Waters XBridge Prep C8 OBD, 5 micras, 30 x 150 milímetros, Parte No. 186003083
- Machery-Nagel Nucleosil® 100-5 C18, 5 micras, 250 X 40 milímetros, Parte No. 715340.400.

Las fases móviles consistieron en el eluyente A (ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en H_2O), y el eluyente B (acetonitrilo (ACN)). Los gradientes se diseñaron basándose en los requerimientos específicos del problema de la separación. Los productos puros se liofilizaron a partir de ACN/H_2O.

Los productos se analizaron mediante HPLC analítica utilizando detección UV a λ = 214 nanómetros (Columna: Bischoff UHC-640, 53 x 4.0 milímetros, ProntoSil 120-3-C18-H, 3 micras, Parte No. 0604F185PS030). Las fases móviles consistieron en el eluyente A (ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.07 por ciento en H_2O), y el eluyente B (ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en acetonitrilo (ACN)). La caracterización adicional de los productos se hizo mediante UPLC-MS (Columna: Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 micras, 2.1 x 50 milímetros, Parte No. 186002350), utilizando ionización por electroaspersión.

Los péptidos que son ejemplificados en la Tabla 4 se

sintetizaron utilizando los procedimientos generales descritos más adelante. Los términos N o C insustituidos se indican mediante itálicas *H-* u *-OH*, respectivamente.

Tabla 4

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 1	*p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-D-fenetil-amina	8	Lactama K^{6}-D^{12}
Ejemplo 2	*p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-E-fenetil-amina	9	Lactama K^{6}-E^{12}
Ejemplo 3	*p*E-R-P-R-L-Orn-H-F-G-P-Nle-D-fenetil-amina	10	Lactama O^{6}-D^{12}
Ejemplo 4	*p*E-R-P-R-L-Dab-H-F-G-P-Nle-D-fenetil-amina	11	Lactama Dab^{6}-D^{12}
Ejemplo 5	*p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-F	12	Lactama K^{6}-término C
Ejemplo 6	*p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-f	13	Lactama K^{6}-término C
Ejemplo 7	Q-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-G-G	14	Lactama término N- término C,

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
			Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 8	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	15	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 9	*p*E-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	16	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 10	*p*E-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	17	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 11	*H*-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	18	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 12	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-fenetil-amina	19	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 13	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	20	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 14	*p*E-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C-F-*OH*	21	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 15	*p*E-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	22	Disulfuro C^6-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 16	*H*-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	23	Disulfuro C^5-C^{11}
Ejemplo 17	*H*-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	24	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 18	*H*-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	25	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 19	*p*E-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C-fenetil-amina	26	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 20	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-Aib-P-Nle-C-F-*OH*	27	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 21	*p*E-R-P-R-L-C-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C-F-*OH*	28	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 22	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Palmitoil)-*OH*	29	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 23	*p*E-R-P-R-L-C-K(Palmitoil)-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	30	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 24	Palmitoil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	31	Disulfuro C^6-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 25	Lauroil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	32	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 26	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroil)-*OH*	33	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 27	*p*E-R-P-R-L-C-K(Lauroil)-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	34	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 28	*p*E-R-P-C-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	35	Disulfuros C^6-C^{12}, C^4-C^7
Ejemplo 29	*p*E-R-C-R-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	36	Disulfuros C^6-C^{12}, C^3-C^7
Ejemplo 30	*p*E-r-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	37	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 31	*p*E-F-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	38	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 32	*p*E-E-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	39	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 33	*p*E-R-p-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	40	Disulfuro C^6-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 34	*p*E-R-K-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	41	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 35	*p*E-R-D-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	42	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 36	*p*E-R-P-F-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	43	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 37	*p*E-R-P-R-K-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	44	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 38	*p*E-R-P-R-L-C-H-E-G-P-Nle-C-F-*OH*	45	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 39	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-D-P-Nle-C-F-*OH*	46	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 40	*p*E-R-P-E-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	47	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 41	*p*E-R-P-R-(4-PhF)-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	48	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 42	*p*E-R-P-R-D-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	49	Disulfuro C^6-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 43	*p*E-R-P-R-L-C-E-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	50	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 44	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-L-P-Nle-C-F-*OH*	51	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 45	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-R-P-Nle-C-F-*OH*	52	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 46	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-(Ácido pipecólico)-Nle-C-F-*OH*	53	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 47	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-(3-PyA)-C-F-*OH*	54	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 48	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-H-*OH*	55	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 49	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-E-*OH*	56	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 50	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-*OH*	57	Disulfuro C^{6}-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 51	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-*h*C-F-*OH*	58	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 52	*p*E-R-P-R-L-*h*C-H-K-G-P-Nle-*h*C-F-*OH*	59	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 53	*p*E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH*	60	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 54	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)-F-*OH*	61	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 55	*p*E-R-P-R-L-(D-*h*C)-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)-F-*OH*	62	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 56	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-c-F-*OH*	63	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 57	*p*E-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-c-F-*OH*	64	Disulfuro C^6-C^{12}
Ejemplo 58	Miristoil-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	65	Disulfuro C^6-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 59	Miristoil-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	66	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 60	Miristoil-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH*	67	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 61	*p*E-R-P-R-L-C-H-K(Miristoil)-G-P-Nle-C-F-*OH*	68	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 62	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-NH_2	69	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 63	*p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-NH_2	70	Disulfuro C^{6}-C^{12}
Ejemplo 64	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	71	-S-CH_2-C(=O)CH_2-S-[C^{6}-C^{12}]
Ejemplo 65	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	72	Monosulfuro C^{6}-C^{12}

Ejemplo	Secuencia	SEQ ID NO:	Tipo de Anillo
Ejemplo 66	*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH*	73	-S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-[C^6-C^{12}]

Métodos analíticos

1) HPLC - Método analítico A

- Columna: Bischoff UHC-640 (53 x 4.0 milímetros) con ProntoSil 120-3-C18-H, 3 micras; Parte Número: 0604F185PS030.
- Eluyente A: Ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.07 por ciento en agua / Eluyente B: ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en acetonitrilo (ACN).
- Flujo: 1.5 mililitros / minuto.
- Temperatura: 40°C.
- Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0.0	90	10
9.5	0	100
12.0	0	100
12.2	90	10

2a) UPLC-MS - Método analítico B

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 micras, 2.1 x 50 milímetros; Parte Número: 186002350.
- Eluyente A: Ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en agua; Eluyente B: Ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en acetonitrilo (ACN).
- Flujo: 0.7 mililitros / minuto.
- Temperatura: 40°C.
- Gradiente:

Tiempo [min]	**A [%]**	**B [%]**
0 .0	80	20
1.0	75	25
4.2	10	90
4.3	0	100
4.6	80	20

2b) UPLC-MS - Método analítico C

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 micras, 2.1 x 50 milímetros; Parte Número: 186002350.
- Eluyente A: Ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en agua; Eluyente B: Ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en

acetonitrilo (ACN).

- Flujo: 0.7 mililitros / minuto.
- Temperatura: 40°C.
- Gradiente:

Tiempo [min]	A [%]	B [%]
0.0	99	1
1.0	97	3
3.5	50	50
4.0	10	90
4.3	0	100
4.6	80	20

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

Tabla 5

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Ejemplo 1	4.16	A	766.3	511.2	C	766.4	511.3
Ejemplo 2	4.18	A	773.5	515.8	C	773.4	516.0
Ejemplo 3	4.14	A		506.6	C	759.4	506.6
Ejemplo 4	4.15	A	752.4	501.9	C	752.4	501.9
Ejemplo 5	3.70	A		484.5	C	726.4	484.6
Ejemplo 6	3.84	A		484.5	C	726.4	484.6
Ejemplo 7	3.85	A		553.6	C	829.9	553.6
Ejemplo 8	3.43	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6
Ejemplo 9	3.77	A		495.2	C	742.4	495.3
Ejemplo 10	3.74	A	742.5	495.1	C	742.4	495.3
Ejemplo 11	3.61	A	742.9	495.2	C	742.4	495.3
Ejemplo 12	3.62	A		497.8	C	746.4	497.9
Ejemplo 13	3.49	A	768.3	512.5	C	768.4	512.6
Ejemplo 14	4.14	A	808.5	539.2	C	808.4	539.3

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Ejemplo 15	3.99	A	773.4	515.8	C	773.4	515.9
Ejemplo 16	3.36	A		475.5	C	712.9	475.6
Ejemplo 17	3.28	A		527.5	C	790.9	527.6
Ejemplo 18	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
Ejemplo 19	4.38	A	756.0	504.2	C	755.9	504.3
Ejemplo 20	3.17	A	782.6	522.0	C	782.4	521.9
Ejemplo 21	3.45	A		512.0	C	767.4	511.9
Ejemplo 22	6.12	A		585.6	B	878.0	585.7
Ejemplo 23	6.46	A	883.2	588.9	B	883.0	589.0
Ejemplo 24	5.20	A		646.0	B	968.6	646.0
Ejemplo 25	5.18	A		627.3	B	940.5	627.3
Ejemplo 26	5.11	A		567.0	B	850.0	567.0
Ejemplo 27	5.44	A		570.0	B	855.0	570.3
Ejemplo 28	4.16	A	723.7		C	723.8	482.9

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Ejemplo 29	3.85	A	753.0	502.5	C	753.3	502.6
Ejemplo 30	3.39	A		512.5	C	768.4	512.6
Ejemplo 31	4.08	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
Ejemplo 32	3.59	A	754.8	503.6	C	754.9	503.6
Ejemplo 33	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
Ejemplo 34	3.14	A		522.8	C	783.9	522.9
Ejemplo 35	3.36	A		518.5	C	777.4	518.6
Ejemplo 36	3.91	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
Ejemplo 37	3.05	A		517.5	C	775.9	517.6
Ejemplo 38	3.67	A	768.7	512.8	C	768.9	512.9
Ejemplo 39	3.47	A		531.7	C	797.4	531.9
Ejemplo 40	3.60	A	754.9	503.6	C	754.9	503.6
Ejemplo 41	3.91	A		549.1	C	823.4	549.3
Ejemplo 42	3.10	A	769.2	513.1	C	769.4	513.2

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Ejemplo 43	3.58	A	764.2	509.7	C	764.4	509.9
Ejemplo 44	3.82	A		531.1	C	796.4	531.3
Ejemplo 45	3.16	A		545.5	C	817.9	545.6
Ejemplo 46	3.54	A		517.1	C	775.4	517.3
Ejemplo 47	2.53	A		524.1	C	785.9	524.3
Ejemplo 48	2.49	A		509.2	C	763.4	509.3
Ejemplo 49	2.73	A	759.3	506.5	C	759.4	506.6
Ejemplo 50	2.72	A	694.5		C	694.8	463.6
Ejemplo 51	3.38	A		517.1	C	775.4	517.3
Ejemplo 52	3.45	A		521.9	C	782.4	521.9
Ejemplo 53	3.52	A	768.4	512.5	C	768.4	512.6
Ejemplo 54	3.43	A	775.3	517.1	C	775.4	517.3
Ejemplo 55	3.83	A	782.3	521.8	C	782.4	521.9
Ejemplo 56	3.42	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6

	HPLC		Espectrometría de masas				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calc.)	**$[M+3H]^{3+}$** (calc.)
Ejemplo 57	3.66	A	768.3	512.4	C	768.4	512.6
Ejemplo 58	5.68	A		685.0	B	1027.1	685.0
Ejemplo 59	5.58	A		733.4	B	1099.6	733.4
Ejemplo 60	5.55	A		781.8	B	1172.1	781.8
Ejemplo 61	3.18	D	874.5	582.9	D	873.5	585.7
Ejemplo 62	3.22	A		512.3	C	767.9	512.3
Ejemplo 63	2.71	A	694.3	463.1	C	694.4	463.2

Procedimientos generales de síntesis

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

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (1 equivalente, de 1.0 a 1.6 milimoles/gramo) se lavó completamente con dicloro-metano (DCM). El aminoácido deseado (típicamente de 0.5 a 2 equivalentes en relación con la resina, considerando una carga de 1.6 milimoles/gramo) se disolvió en dicloro-metano (DCM) (aproximadamente 10 mililitros por gramo de resina), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (4 equivalentes en relación con la resina,

considerando una carga de 1.6 milimoles/gramo). La solución se agregó a la resina, y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. La resina se drenó, y entonces se lavó completamente en secuencia con dicloro-metano (DCM)/MeOH/ DIPEA (17:2:1), dicloro-metano (DCM), DMA, dicloro-metano (DCM).

Para la remoción de Fmoc y la determinación de la carga, la resina se agitó repetidamente con piperidina/DMA (1:4) o con 4-metil-piperidina/DMA (1:4) (12 x 10 mililitros por gramo de la resina inicial), y se lavó con DMA (10 mililitros, 2 veces por gramo de la resina inicial). Las soluciones combinadas se diluyeron con metanol hasta un volumen ***V*** de 250 mililitros por gramo de la resina inicial. Una alícuota de 2 mililitros (V_a) de esta solución se diluyó adicionalmente hasta 250 mililitros (V_t) con metanol. La absorción UV se midió a 299.8 nanómetros contra una referencia de MeOH, dando la absorción ***A***. La resina se lavó completamente en secuencia con DMA, dicloro-metano (DCM), DMA, dicloro-metano (DCM), y se secó en un alto vacío a 40°C, proporcionando ***m*** gramos de resina.

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

Carga [moles/gramo] = $(A \times V_t \times V)/(d \times \varepsilon \times V_a \times m)$

(con d: anchura de cubeta; ε = 7800 L mol^{-1} cm^{-1})

2) Síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador Prelude[MR]

2a) Ciclo de síntesis A

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se removió mediante el tratamiento repetitivo con 4-metil-piperidina/DMA (1:4). La resina se

lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 equivalentes; solución 0.2 M en NMP), HCTU (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (3.3 equivalentes; solución 0.66 M en NMP), seguida por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 minutos a 4 horas, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, típicamente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA se llevó a cabo el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/ DMA (1:1:8), y la mezcla subsiguiente de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2b) Ciclo de síntesis B

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se removió mediante el tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), HCTU (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (4.5 equivalentes; solución 0.9 M en NMP), seguida por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 minutos a 4 horas, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, típicamente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, se llevó a cabo el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/

DMA (1:1:8), y la mezcla subsiguiente de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2c) Ciclo de síntesis C

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se removió mediante el tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición del Fmoc-aminoácido (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), HCTU (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (6 equivalentes; solución 0.9 M en NMP), seguida por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 minutos a 4 horas, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, típicamente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, se llevó a cabo el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/ DMA (1:1:8), y la mezcla subsiguiente de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2d) Ciclo de síntesis D

La resina se lavó con DMA. El Fmoc se removió mediante el tratamiento repetitivo con 4-metil-piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se hizo mediante la adición de una mezcla del Fmoc-aminoácido y Oxima Pura (3 equivalentes de cada uno; 0.2 M de ambos en NMP), y DIC (3 equivalentes; solución 0.3 M en NMP), seguida por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 minutos a 4 horas,

dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, típicamente se repitió el paso de acoplamiento de 1 a 3 veces, dependiendo de los requerimientos específicos. Después de lavar con DMA, se llevó a cabo el tapado mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8), y la mezcla subsiguiente de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

3) Disociación a partir de la resina con o sin la remoción concomitante de los grupos protectores

3a) Método de disociación A

La resina (0.1 milimoles) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas con el 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros). La solución de disociación se filtró, y se agregó solución fresca (3 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, entonces la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (3 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío.

3b) Método de disociación B

La resina (0.1 milimoles) se trató con el 95 por ciento de ácido

trifluoro-acético (TFA) acuoso / EDT (4:1) (0.75 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso (2.18 mililitros), y TES (75 microlitros), y se reasumió la agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró entonces, se agregó a la resina el 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró y se recolectó, y se agregó solución fresca (3 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, entonces la solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros). El precipitado formado de esta manera se dejó asentarse, se centrifugó, y entonces el sobrenadante se vertió cuidadosamente. El precipitado se lavó una vez con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El residuo se secó en un alto vacío.

3c) Método de disociación C

Se agregaron HFIP/DCM (30:70) (5 mililitros) a la resina (0.1 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La solución de disociación se filtró y se recolectó, y se agregaron HFIP/DCM frescos (30:70) (5 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de disociación se filtró y se recolectó. La resina se lavó con dicloro-

metano (DCM) (5 mililitros, 2 veces), el cual también se recolectó. Las soluciones de disociación y lavado combinadas se concentraron hasta obtener la sequedad en un alto vacío. El residuo se liofilizó a partir de tBuOH/H_2O (1:1).

4) Métodos de ciclación

4a) Método de ciclación A *(Formación de disulfuro)*

El péptido precursor lineal completamente desprotegido se disolvió en H_2O/sulfóxido de dimetilo (DMSO) (9:1) o (4:1), para dar típicamente una concentración de 1 a 15 miligramos/mililitro. La mezcla de reacción se agitó luego a temperatura ambiente durante típicamente 40 horas, dependiendo de los requerimientos, y entonces se concentró a sequedad en un alto vacío.

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

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente) se disolvió en H_2O para dar típicamente una concentración de 10 miligramos/mililitro. Se agregó una solución de I_2 50 mM en AcOH (1.2 equivalentes) en una porción a la solución agitada, y la reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. se agregó ácido ascórbico 0.5 M en H_2O (1.5 equivalentes) para apagar el exceso de I_2. La solución se concentró hasta casi la sequedad al vacío.

4c) Método de ciclación C *(Formación selectiva de dos disulfuros)*

El péptido precursor lineal parcialmente protegido (1 equivalente) (dos cisteínas fueron protegidas con Acm y dos

cisteínas quedaron desprotegidas) se disolvió en AcOH/H_2O (4:1), para dar típicamente una concentración de 1 miligramo/mililitro. Se agregó I_2 50 mM en AcOH (2 equivalentes), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó más I_2 50 mM en AcOH (10 equivalentes) en porciones durante 4 horas. Después de 21 horas, la mezcla de reacción se concentró hasta casi la sequedad al vacío, y se agregó ácido ascórbico 1 M en H_2O en exceso para apagar el I_2 sin reaccionar.

4d) Método de ciclación D (*Formación de lactama entre las cadenas laterales*)

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente), y HATU (1.5 equivalentes), se disolvieron en NMP (concentración del péptido: típicamente 1 milimol/litro). Se agregó di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (3 equivalentes), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío.

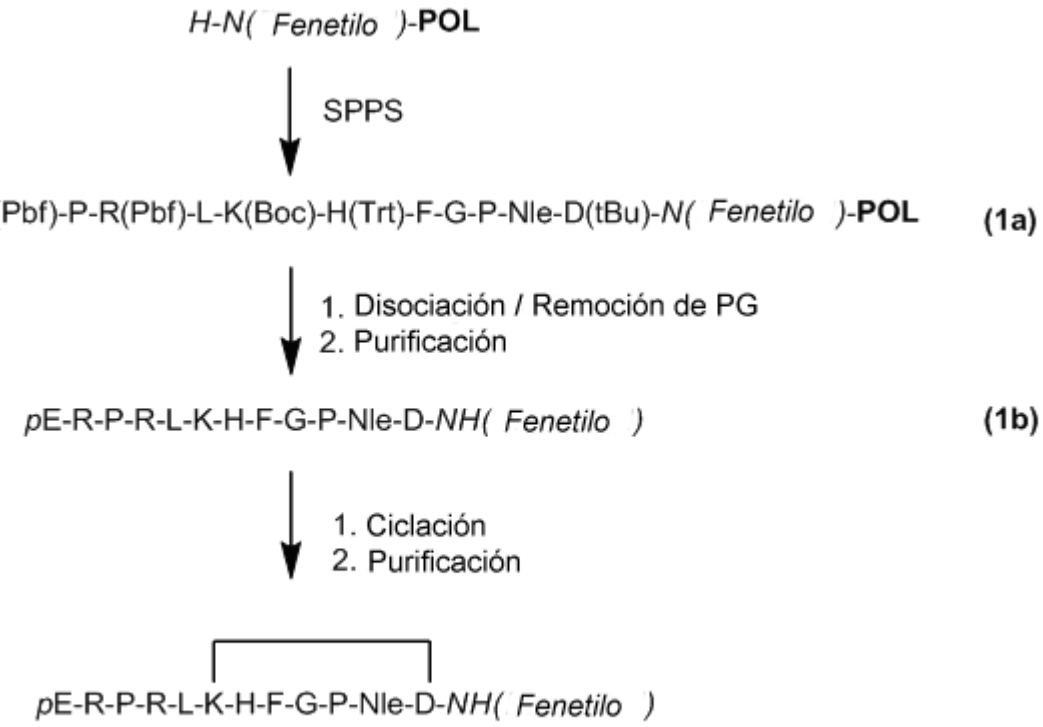
4e) Método de ciclación E (*Formación de lactama entre la cadena lateral y el término C*)

Una solución del péptido (1 equivalente), HATU (1.3 equivalentes), y HOAt (1.3 equivalentes) en N,N-dimetil-formamida (DMF) (concentración del péptido: 2.6 milimoles/litro), se trató con 2,6-lutidina (20 equivalentes), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío.

En lo siguiente, se describen las síntesis de los ejemplos

representativos.

Ejemplo 1 Síntesis de *p*E-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-D-fenetil-amina (SEQ ID NO: 8) (lactama K^{6}-D^{12}). El siguiente Ejemplo 1 da a conocer la SEQ ID NO: 8.



Ejemplo 1

- Preparación del Intermediario **1a**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

La resina de fenetil-amina-BAL-PS (167 miligramos, 0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR}. El acoplamiento se llevó a cabo

como sigue:

Acopla-miento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	D(tBu)	2 x 4 h	C
2	Nle	1 x 3 h	C
3	P	2 x 45 min	C
4	G	2 x 90 min	C
5	F	1 x 3 h	C
6	H(Trt)	2 x 45 min	C
7	K(Boc)	2 x 4 h	C
8	L	4 x 1 h	C
9	R(Pbf)	4 x 1 h	C
10	P	2 x 90 min	C
11	R(Pbf)	4 x 1 h	C

Acopla-miento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
12	*p*E	2 x 90 min	C

- Preparación del Intermediario **1b**
- *(Disociación a partir de la resina con la remoción concomitante del grupo protector y luego la purificación)*

Una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (2 mililitros) se agregó al intermediario **1a** (0.1 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La solución de disociación se filtró, y se agregó solución de disociación fresca (2 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, y entonces la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (2 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. La solución de disociación se filtró, y la resina se lavó con el 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso (1 mililitro). Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (20 mililitros), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC

de preparación y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el intermediario **1b** como un sólido blanco en dos lotes de diferentes calidades: Lote A (35.9 miligramos (98 por ciento de pureza), 0.018 milimoles), y Lote B (52.9 miligramos (80 por ciento de pureza), 0.021 milimoles).

- Preparación del Ejemplo **1**
- (*Ciclación y purificación)*

Ambos lotes a partir del paso anterior se trataron por separado siguiendo el mismo protocolo:

Lote A: Una solución del péptido (35.9 miligramos (98 por ciento de pureza), 0.018 milimoles), y HATU (10.0 miligramos, 0.026 milimoles) en NMP (18 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (9.2 microlitros, 0.053 milimoles), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.

Lote B: Una solución del péptido (52.9 miligramos (80 por ciento de pureza), 0.021 milimoles), y HATU (14.5 miligramos, 0.038 milimoles) en NMP (26 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (13.0 microlitros, 0.076 milimoles), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.

Cada uno de los lotes se concentró hasta la sequedad al vacío. El producto se aisló mediante HPLC de preparación. Las fracciones puras de ambas purificaciones se combinaron y se liofilizaron a partir de ACN/H_2O para dar el Ejemplo **1** como un sólido blanco (52.0 miligramos, 0.025 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método

analítico A: t_R = 4.16 minutos), y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$ = 511.2; calculado: $[M+3]^{3+}$ = 511.3).

Ejemplo 5 Síntesis *p*E-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-F (SEQ ID NO: 12) (Lactama K^6-término C). El siguiente Ejemplo 5 da a conocer la SEQ ID NO: 12)

Cl-**POL**

↓ Carga de resina

H-F-*O*-**POL** **(5a)**

↓ SPPS

*p*E-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-K(ivDde)-F-K(Boc)-G-P-Nle-F-*O*-**POL** **(5b)**

↓ 1. Remoción de ivDde
2. Disociación con HFIP

*p*E-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-K-F-K(Boc)-G-P-Nle-F-*OH* **(5c)**

↓ Ciclación

*p*E-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-K(-)-F-K(Boc)-G-P-Nle-F(-) **(5d)**

↓ 1. Remoción de PG
2. Purificación

*p*E-R-P-R-L-K(-)-F-K-G-P-Nle-F(-)

Ejemplo 5

- Preparación del Intermediario **5a**
- *(Carga de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo con Fmoc-F-OH, remoción de Fmoc, y determinación de la carga de la resina)*

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (10.0 gramos, 16.0 milimoles) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-F-OH (6.24 gramos, 32.0 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (100 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (11.2 mililitros, 64.0 milimoles), en analogía al procedimiento general descrito anteriormente, para dar el Intermediario **5a** (12.8 gramos, carga = 0.79 milimoles/gramo).

- Preparación del Intermediario **5b**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

El intermediario **5a** (0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR}. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acopla-miento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
2	Nle	2 x 90 min	B
3	P	2 x 30 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(ivDde)	2 x 30 min	B
6	F	2 x 30 min	B

Acopla-miento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
7	K(Boc)	4 x 1 h	B
8	L	2 x 30 min	B
9	R(Pbf)	4 x 1 h	B
10	P	2 x 90 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	*p*E	2 x 90 min	B

- Preparación del Intermediario **5c**
- *(Remoción de ivDde y disociación a partir de la resina)*

El intermediario **5b** (0.100 milimoles) se trató seis veces durante 10 minutos con una solución de monohidrato de hidrazina (0.081 mililitros, 1.67 milimoles) en N,N-dimetil-acetamida (4 mililitros). Entonces la resina se trató tres veces durante 20 minutos con una solución de monohidrato de hidrazina (0.081 mililitros, 1.67 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (4 mililitros). La resina se lavó con dicloro-metano (DCM) (3 veces). Se agregaron HFIP/DCM (30:70) (5 mililitros) a la resina (0.100 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La solución de disociación se filtró y se agregaron HFIP/DCM frescos (30:70) (5 mililitros). La

suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de disociación se filtró. La resina se lavó con dicloro-metano (DCM) (5 mililitros, 2 veces). Las soluciones de disociación y de lavado combinadas se concentraron hasta obtener la sequedad al vacío. El residuo se liofilizó a partir de tBuOH/H_2O (1:1), para dar el Intermediario **5c** (187 miligramos, 0.090 milimoles).

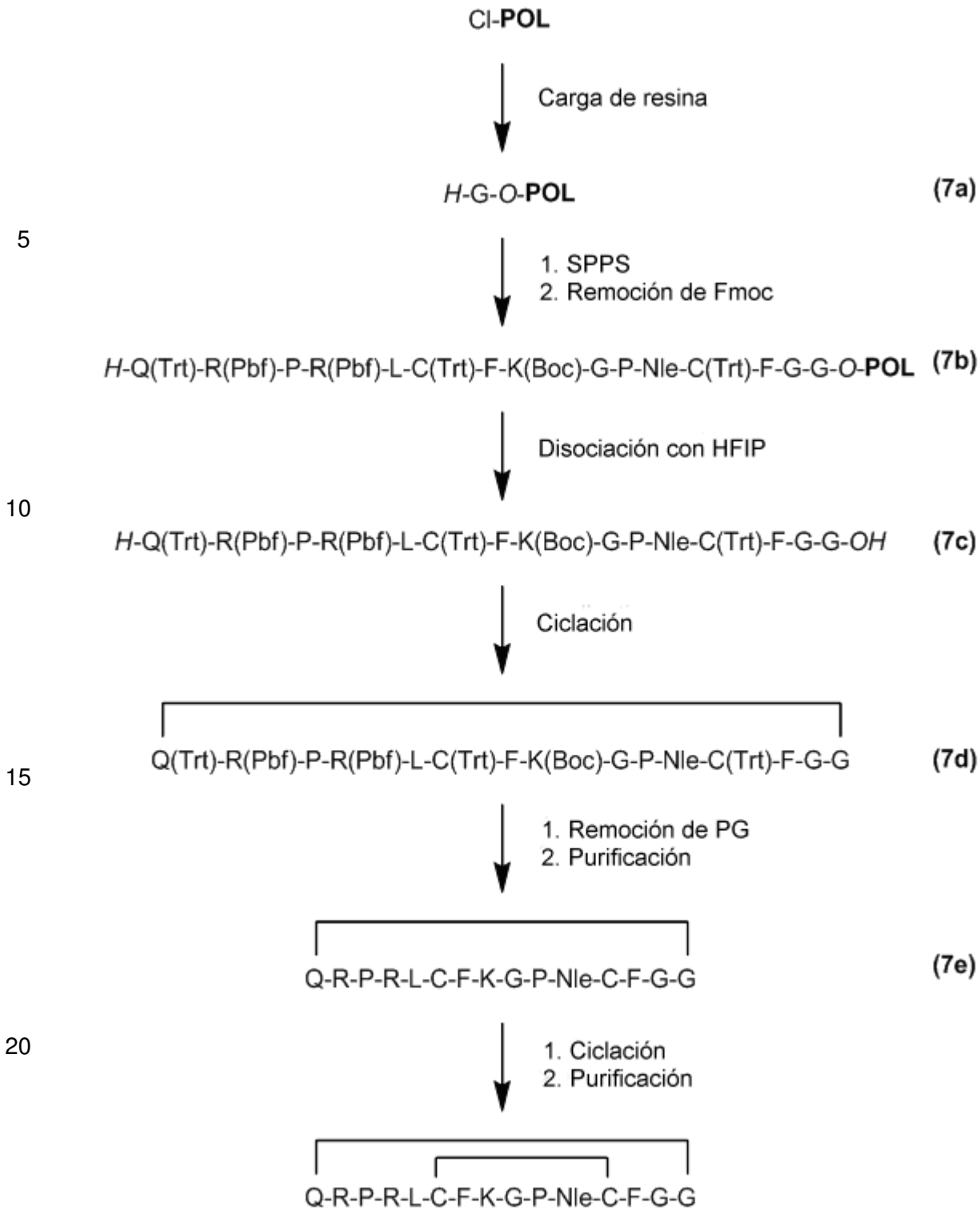
- Preparación del Ejemplo **5**
- *(Ciclación y remoción de los grupos protectores)*

Una solución del Intermediario **5c** (187 miligramos, 0.090 milimoles), HATU (44.6 miligramos, 0.117 milimoles), y HOAt (16.0 miligramos, 0.117 milimoles) en N,N-dimetil-formamida (DMF) (35 mililitros), se trató con 2,6-lutidina (0.210 mililitros, 1.80 milimoles), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío. El residuo se disolvió en el 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (5 mililitros), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La solución de disociación se vertió sobre heptano/dietil-éter fríos (1:1) (30 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El paso de lavado se repitió una vez. El residuo se secó en un alto vacío. El producto se aisló mediante HPLC de preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **5** como un sólido blanco (41.4 miligramos,

0.023 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 3.70 minutos), y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$ = 484.5; calculado: $[M+3]^{3+}$ = 484.6).

Ejemplo 7 Síntesis de Q-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C-F-G-G (SEQ ID NO: 14) (Lactama término N - término C). El siguiente Ejemplo 7 da a conocer la SEQ ID NO: 14.



Ejemplo 7

- Preparación del Intermediario **7a**

- *(Carga de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo con Fmoc-Gly-OH, remoción de Fmoc, y determinación de la carga de la resina)*

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (2.00 gramos, 3.20 milimoles) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-Gly-OH (0.476 gramos, 1.60 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (20 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (2.24 mililitros, 12.8 milimoles), en analogía al procedimiento general descrito anteriormente, para dar el Intermediario **7a** (2.22 gramos; carga = 0.68 milimoles/gramo).

- Preparación del Intermediario **7b**
- *(Ensamble del péptido lineal remoción de Fmoc)*

El Intermediario **7a** (147 miligramos, 0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR}. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acopla-miento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
1	G	2 x 30 min	B
2	F	2 x 30 min	B
3	C(Trt)	2 x 30 min	B
4	Nle	2 x 90 min	B
5	P	2 x 30 min	B

Acopla-miento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
6	G	2 x 90 min	B
7	K(Boc)	2 x 30 min	B
8	F	2 x 30 min	B
9	C(Trt)	2 x 30 min	B
10	L	2 x 30 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	P	2 x 90 min	B
13	R(Pbf)	4 x 1 h	B
14	Q(Trt)	2 x 90 min	B

Después del ensamble del péptido, se removió el Fmoc mediante el tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA, para proporcionar el intermediario **7b** (0.100 milimoles).

- Preparación del Intermediario **7c**
- *(Disociación de HFIP a partir de la resina)*

Se agregaron HFIP/DCM (30:70) (3 mililitros) al intermediario

7b (0.100 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La solución de disociación se filtró, y se agregaron HFIP/DCM frescos (30:70) (3 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de disociación se filtró. La resina se lavó con dicloro-metano (DCM) (3 mililitros, 2 veces). Las soluciones de disociación y de lavado combinadas se concentraron hasta obtener la sequedad al vacío. El residuo se liofilizó a partir de tBuOH/H_2O (1:1), para dar el Intermediario **7c** (203 miligramos, 0.067 milimoles).

- Preparación del Intermediario **7d**
- *(Ciclación de la estructura base)*

Una solución del Intermediario **7c** (203 miligramos, 0.067 milimoles), HATU (33.3 miligramos, 0.088 milimoles), y HOAt (11.9 miligramos, 0.088 milimoles) en N,N-dimetil-formamida (DMF) (40 mililitros), se trató con 2,6-lutidina (0.157 mililitros, 1.35 milimoles), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad al vacío, para proporcionar el intermediario **7d** (0.067 milimoles).

- Preparación del Intermediario **7e**
- *(Remoción de los grupos protectores, y luego la purificación)*

Una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros), se agregó al intermediario **7d** (0.067 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 horas. La solución se vertió sobre una mezcla de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (30 mililitros), dando un precipitado.

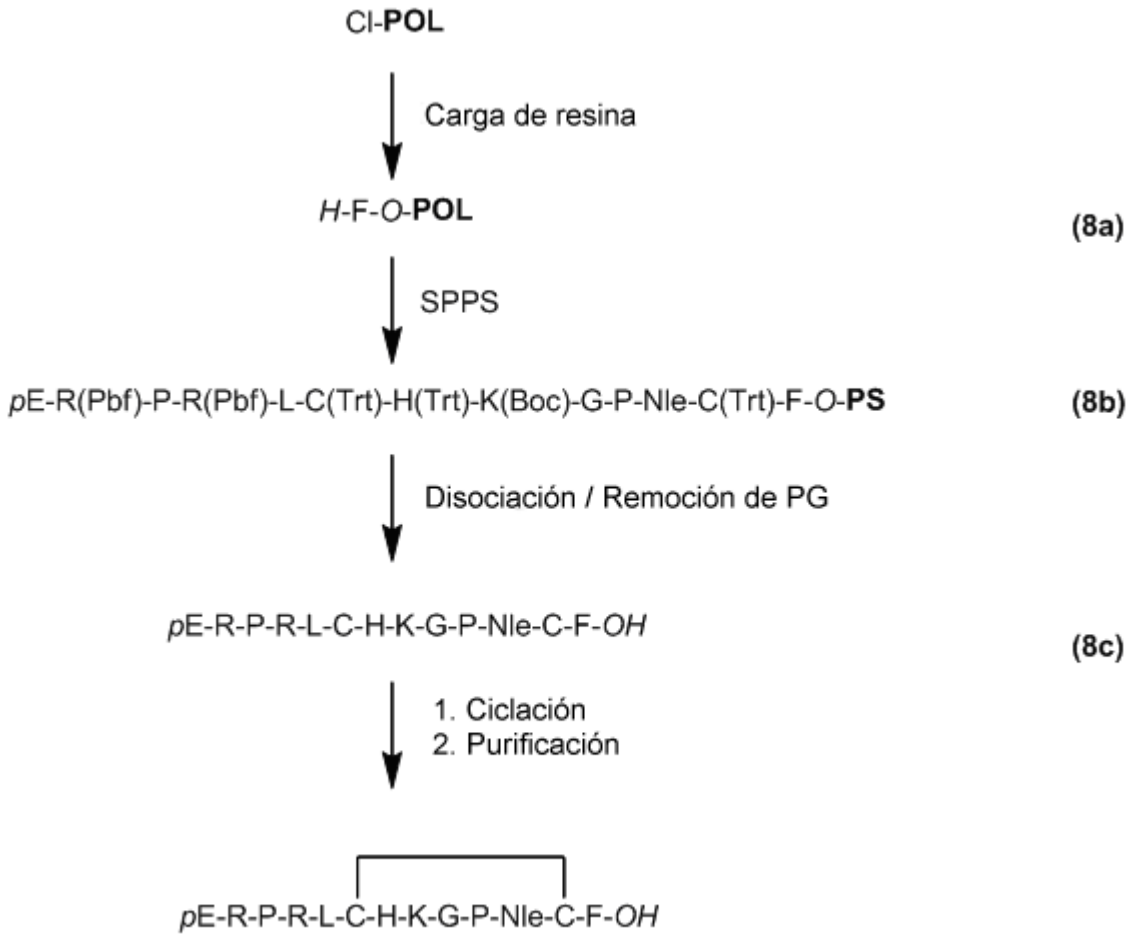
La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El paso de lavado se repitió una vez. El sólido se secó en un alto vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el intermediario **7e** como un sólido blanco (33.6 miligramos, 0.017 milimoles).

- Preparación del Ejemplo **7**
- *(Ciclación y purificación)*

El Intermediario **7e** (33.6 miligramos, 0.017 milimoles) se disolvió en H_2O/sulfóxido de dimetilo (DMSO) (9:1) (30 mililitros). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas; entonces se concentró hasta la sequedad al vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **7** como un sólido blanco (21.0 miligramos; 0.010 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 3.85 minutos), y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$ = 553.6; calculado: $[M+3]^{3+}$=553.6).

Ejemplo 8 Síntesis de *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*OH* (SEQ ID NO: 15) (disulfuro C^6-C^{12}). El siguiente Ejemplo 8 da a conocer la SEQ ID NO: 15.



Ejemplo 8

- Preparación del Intermediario **8a**
- *(Carga de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo con Fmoc-F-OH, remoción de Fmoc, y determinación de la carga de la resina)*

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (40.0 gramos, 64.0 milimoles) se lavó con dicloro-metano (DCM) (3 veces). Se agregó una solución de Fmoc-F-OH (24.8 gramos, 64.0 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (400 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (44.7 mililitros, 256 milimoles), y la suspensión se agitó durante 22 horas a

temperatura ambiente. La resina se lavó completamente con dicloro-metano (DCM)/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3 veces), dicloro-metano (DCM) (3 veces), DMA (3 veces), dicloro-metano (DCM) (3 veces).

La resina entonces se trató cuatro veces durante 10 minutos con una mezcla de piperidina/DMA (1:4) (400 mililitros), seguida por lavado con DMA (180 mililitros, 2 veces). Las soluciones de piperidina/DMA y las soluciones de lavado con DMA se recolectaron para la determinación de la carga de la resina. 1 mililitro de las soluciones combinadas se diluyó hasta 500 mililitros con metanol, y se midió la absorción UV a 299.8 nanómetros como A = 0.368. Esto corresponde a una cantidad de Fmoc de 46.2 milimoles.

La resina se lavó completamente con dicloro-metano (DCM) (3 veces), DMA (3 veces), dicloro-metano (DCM) (3 veces), y se secó al vacío, para dar el Intermediario **8a** (50.7 gramos; carga = 0.91 milimoles/gramo).

- Preparación del Intermediario **8b**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

El Intermediario **8a** (2.64 gramos, 2.40 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR}. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acopla-miento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
1	C(Trt)	2 x 30 min	D

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

- Preparación del Intermediario **8c**
- *(Disociación a partir de la resina con la remoción concomitante del grupo protector)*

El Intermediario **8b** (2.40 milimoles) se lavó cuidadosamente con dicloro-metano (DCM) (4 veces). Se agregó una mezcla del 95

por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (50 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró, y se agregó solución de disociación fresca (35 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (35 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla agitada de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (500 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y entonces el precipitado se dejó asentarse. El sobrenadante se succionó con una frita. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (100 mililitros, 2 veces), y el sobrenadante se succionó con una frita. El sólido se secó en un alto vacío, para proporcionar el intermediario **8c** como un sólido grisáceo (3.75 gramos, 1.88 milimoles).

- Preparación del Ejemplo **8**
- *(Ciclación y purificación)*

El Intermediario **8c** (3.75 gramos, 1.88 milimoles) se disolvió en H_2O (375 mililitros). Se agregó una solución de I_2 50 mM en AcOH (45.1 mililitros, 2.26 milimoles) en una porción a la solución agitada, y la solución se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó ácido ascórbico 0.5 M en H_2O (5.64 mililitros, 2.82 milimoles), para apagar el exceso de I_2. La solución se concentró hasta casi la

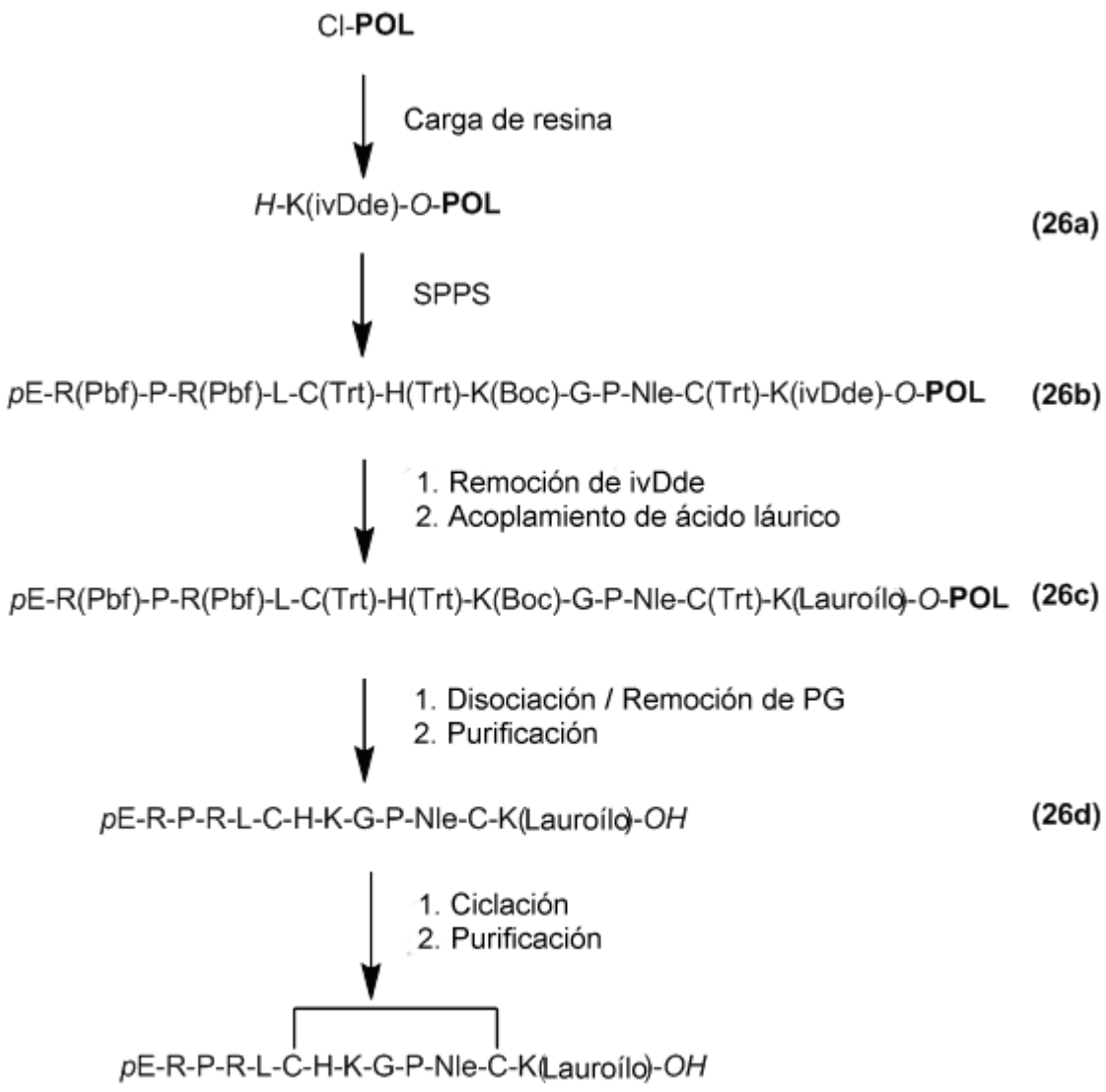
sequedad. La reacción se llevó a cabo en dos porciones: escala de 0.188 milimoles y escala de 1.69 milimoles. Los productos crudos se combinaron para la purificación. El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **8**, como un sólido blanco (1.53 gramos, 0.767 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico C: t_R = 3.43 minutos), y UPLC-MS (Método analítico B; medido: $[M+3]^{3+}$ = 512.4; calculado: $[M+3]^{3+}$ = 512.6).

De una manera alternativa, el polipéptido crudo del Ejemplo 8 se disolvió en agua (500 mililitros de agua/milimol de polipéptido), y se convirtió en la sal de acetato con la ayuda de una resina de intercambio de iones (es decir, Amberlite IRA-67 (forma de acetato) (200 gramos/milimol de polipéptido), y se purificó mediante HPLC de preparación (C8 gel de sílice en fase inversa modificada de Daisogel, gradiente: ACN/H_2O: 3 por ciento de acetonitrilo (ACN) y 97 por ciento de [mezcla de ácido acético al 0.3 por ciento / agua] hasta el 12 por ciento de acetonitrilo (ACN) y 88 por ciento de [mezcla de ácido acético al 0.3 por ciento / agua]), y se liofilizó, para proporcionar una sal de acetato del Ejemplo 8 como un sólido blanco (del 60 al 100 por ciento de rendimiento).

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

Ejemplo 26 Síntesis de *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-K(Lauroil)-*OH* (SEQ ID NO: 33) (disulfuro C^6-C^{12}). El siguiente Ejemplo 26 da a conocer la SEQ ID NO: 33.



Ejemplo 26

- Preparación del Intermediario **26a**
- *(Carga de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo con Fmoc-K(ivDde)-OH, remoción de Fmoc, y determinación de la carga de la resina)*

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (1.00 gramos, 1.60 milimoles) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-K(ivDde)-OH (1.84 gramos, 3.20 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (10 mililitros), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (1.12 mililitros, 6.40 milimoles), en analogía al procedimiento general descrito anteriormente, para dar el Intermediario **26a** (1.39 gramos; carga = 0.75 milimoles/gramo).

- Preparación del Intermediario **26b**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

El Intermediario **26a** (134 miligramos, 0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude^{MR}. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acopla-miento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
1	C(Trt)	2 x 30 min	B
2	Nle	2 x 30 min	B

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

- Preparación del Intermediario **26c**
- *(Remoción de ivDde y acoplamiento de ácido láurico)*

El Intermediario **26b** (0.100 milimoles) se lavó con tetrahidrofurano (THF) (3 veces). Se agregó una solución de monohidrato de hidrazina (0.245 mililitros, 5.00 milimoles) en tetrahidrofurano (THF)

(12 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución se filtró. Este paso se hizo dos veces más. La resina se lavó con DMA (3 veces), dicloro-metano (DCM) (3 veces), DMA (2 veces), dicloro-metano (DCM) (5 veces), y DMA (3 veces). Se disolvieron ácido láurico (100 miligramos, 0.500 milimoles) y HCTU (207 miligramos, 0.500 milimoles) en NMP (3 mililitros) y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (0.087 mililitros, 0.500 milimoles). Después de 5 minutos de activación, la solución se agregó a la resina, y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró, y la resina se lavó con DMA (3 veces), dicloro-metano (DCM) (3 veces), DMA (3 veces), dicloro-metano (DCM) (5 veces), para proporcionar el intermediario **26c**.

- Preparación del Intermediario **26d**
- *(Disociación a partir de la resina con la remoción concomitante del grupo protector, y luego la purificación)*

Una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros), se agregó al intermediario **26c** (0.100 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de disociación se filtró, y se agregó solución de disociación fresca (3 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, entonces la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (3 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación

combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío.

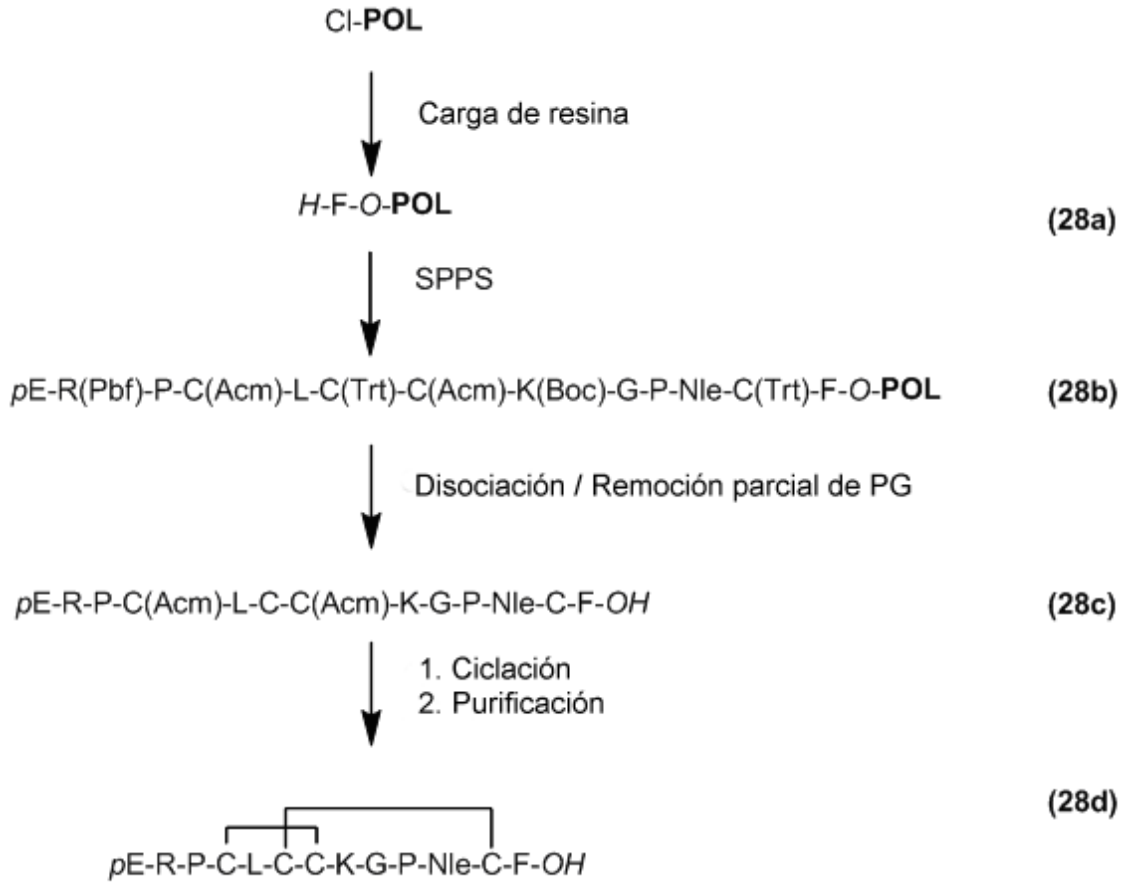
El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el intermediario **26d** como un sólido blanco (74.1 miligramos, 0.034 milimoles).

- Preparación del Ejemplo **26**
- *(Ciclación y purificación)*

El Intermediario **2d** (74.1 miligramos, 0.034 milimoles) se disolvió en H_2O/sulfóxido de dimetilo (DMSO) (9:1) (74 mililitros). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas; entonces se concentró hasta la sequedad al vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **26** como un sólido blanco (60.0 miligramos; 0.028 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 5.11 minutos), y UPLC-MS (Método analítico B; medido: $[M+3]^{3+}$ = 567.0; calculado: $[M+3]^{3+}$ = 567.0).

Ejemplo 28 Síntesis de *p*E-R-P-C-L-C-C-K-G-P-Nle-C-F-*OH* (SEQ ID NO: 35) (disulfuros C^4-C^7 y C^6-C^{12}). El siguiente Ejemplo 28 da a conocer la SEQ ID NO: 35.



Ejemplo 28

- Preparación del Intermediario **28a**
- *(Carga de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo con Fmoc-F-OH, remoción de Fmoc, y determinación de la carga de la resina)*

La resina de cloruro de 2-cloro-tritilo (10.0 gramos, 16.0 mili-moles) se hizo reaccionar con una solución de Fmoc-F-OH (6.20 gramos, 16.0 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (100 mililitros) y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (11.2 mililitros, 64.0 milimoles), en analogía al procedimiento general descrito anteriormente, para dar el

Intermediario **28a** (11.6 gramos, carga = 0.87 milimoles/gramo).

- Preparación del Intermediario **28b**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

El Intermediario **28a** (115 miligramos, 0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude[MR]. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acopla-miento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
1	C(Trt)	2 x 15 min	B
2	Nle	2 x 15 min	B
3	P	2 x 15 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(Boc)	2 x 15 min	B
6	C(Acm)	2 x 15 min	B
7	C(Trt)	2 x 15 min	B
8	L	2 x 15 min	B
9	C(Acm)	2 x 15 min	B
10	P	2 x 15 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B

Acopla-miento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
12	*p*E	2 x 15 min	B

- Preparación del Intermediario **28c**
- *(Disociación a partir de la resina con la remoción parcial concomitante del grupo protector)*

El Intermediario **28b** (0.100 milimoles)) se lavó cuidadosamente con dicloro-metano (DCM) (4 veces). Se agregó una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso / EDT (4:1) (0.750 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó una mezcla de ácido trifluoro-acético (TFA)/H_2O (95:5) (2.18 mililitros) y TES (75 microlitros) a la suspensión, y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró, y se agregó a la resina una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (3 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de disociación se filtró. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión

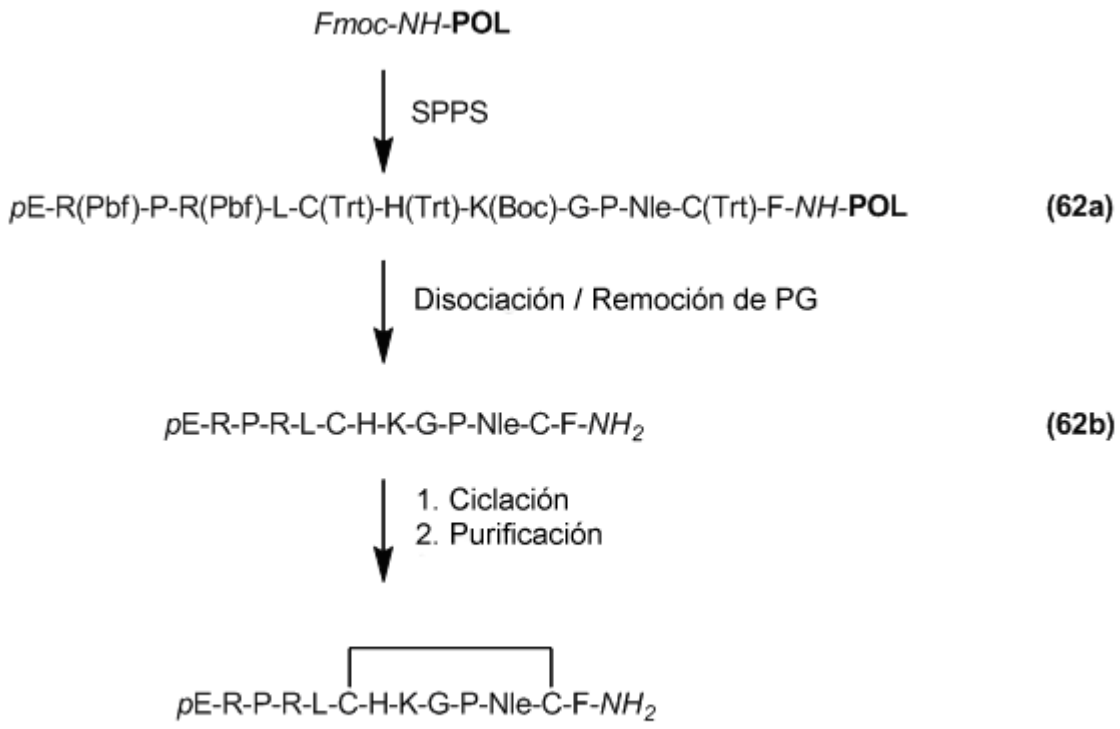
se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El paso de lavado se repitió una vez. El residuo se secó en un alto vacío. El producto crudo se purificó mediante HPLC de preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el intermediario **28c** como un sólido blanco (51.1 miligramos, 0.028 milimoles).

- Preparación del Ejemplo **28**
- *(Formación de dos disulfuros en un recipiente)*

El Intermediario **28c** (51.1 miligramos, 0.028 milimoles) se disolvió en AcOH (48 mililitros) y H_2O (12 mililitros). Se agregó una solución de I_2 50 mM en AcOH (1.12 mililitros, 56 micromoles), y la solución amarilla se agitó a temperatura ambiente. Se agregó más I_2 50 mM en AcOH (5.61 mililitros, 0.281 milimoles) en porciones durante 4 horas. Después de 21 horas, la mezcla de reacción se concentró hasta 2 mililitros al vacío, y se agregó ácido ascórbico 1 M en H_2O (6 mililitros), para apagar el exceso de I_2. El producto se aisló mediante HPLC de preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **28**, como un sólido blanco (19.3 miligramos, 0.012 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 4.16 minutos), y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+2]^{2+}$ = 723.7; calculado: $[M+2]^{2+}$ = 723.8).

Ejemplo 62 Síntesis de *p*E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-*NH_2* (SEQ ID NO: 69) (disulfuro C^6-C^{12}). El siguiente Ejemplo 62 da a conocer la SEQ ID NO: 69.



Ejemplo 62

- Preparación del Intermediario **62a**
- *(Ensamble del péptido lineal)*

La resina de Rink-Amida-AM-PS protegida por Fmoc (217 miligramos, 0.100 milimoles) se sometió a síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude[MR]. El acoplamiento se llevó a cabo como sigue:

Acoplamiento	**AA**	**Número de acoplamientos x Tiempo de reacción**	**Ciclo de síntesis**
1	F	2 X 15 min	A

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

- Preparación del Intermediario **62b**
- *(Disociación a partir de la resina con la remoción*

concomitante del grupo protector)

Una mezcla del 95 por ciento de ácido trifluoro-acético (TFA) acuoso/EDT/TES (95:2.5:2.5) (3 mililitros) se agregó al intermediario **62a** (0.1 milimoles), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La solución de disociación se filtró, y se agregó solución de disociación fresca (2 mililitros). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, y entonces la solución de disociación se filtró. Se agregó solución fresca (2 mililitros), y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las soluciones de disociación combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano/dietil-éter fríos (1:1) (35 mililitros), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano/dietil-éter fríos (1:1) (10 mililitros), la suspensión se centrifugó, y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en un alto vacío. El producto crudo del Intermediario **62b** se utilizó en el siguiente paso sin purificación.

- Preparación del Ejemplo **62**
- *(Ciclación y purificación)*

El Intermediario **62b** (0.100 milimoles) se disolvió en H_2O (20 mililitros). Se agregó una solución de I_2 50 mM en AcOH (2.4 mililitros, 0.120 milimoles) en una porción a la solución agitada, y la solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó ácido ascórbico 0.5 M en H_2O (0.30 mililitros, 0.300 milimoles), para apagar el exceso de I_2. La solución se concentró hasta casi la sequedad. El producto crudo se purificó mediante HPLC de

preparación, y se liofilizó a partir de ACN/H_2O, para proporcionar el Ejemplo **62**, como un sólido blanco (50.5 miligramos, 0.025 milimoles).

El producto puro se analizó mediante HPLC analítica (Método analítico C: t_R = 3.22 minutos), y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$ = 512.3; calculado: $[M+3]^{3+}$ = 512.3).

Los otros ejemplos se sintetizaron en analogía:

- Los **Ejemplos 2 a 4** se sintetizaron en analogía al Ejemplo 1.
- El **Ejemplo 6** se sintetizó en analogía al Ejemplo 5.
- Los **Ejemplos 9 a 25, y 27** se sintetizaron en analogía al Ejemplo 26.
- El **Ejemplo 29** se sintetizó en analogía al Ejemplo 28.
- Los **Ejemplos 30 a 61** se sintetizaron en analogía al Ejemplo 8.
- El **Ejemplo 63** se sintetizó en analogía al Ejemplo 62.

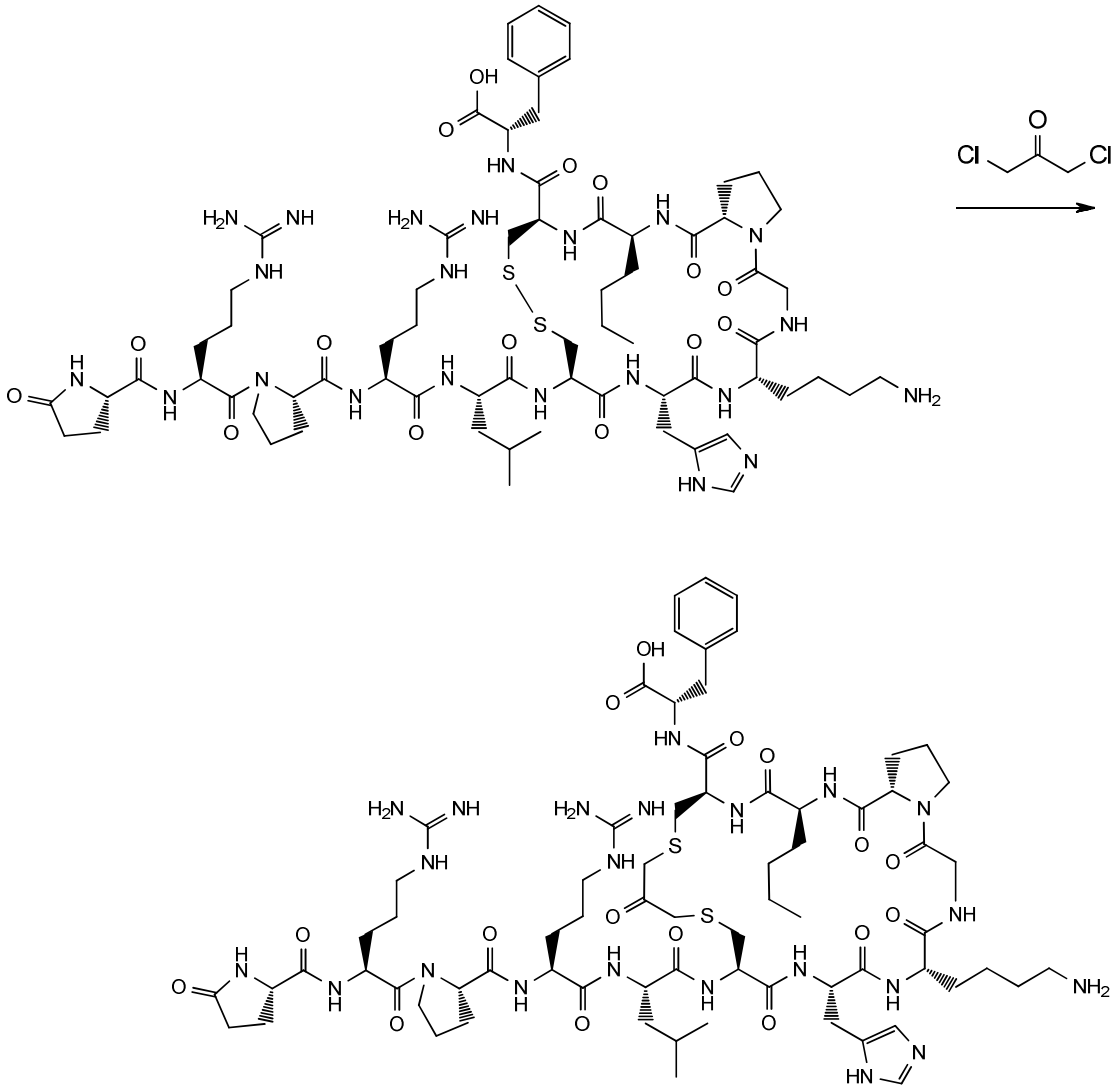
Ejemplo 64: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* (SEQ ID NO: 71) con *un enlace de* -S-CH_2-C(O)CH_2-S- entre las cisteínas en las posiciones 6 y 12 [C^6-C^{12}]

Método analítico

Método D (HRMS);

Eluyente A: agua + ácido fórmico al 0.05 por ciento + acetato de amonio 3.75 mM, Eluyente B : Acetonitrilo + ácido fórmico al 0.04 por ciento.

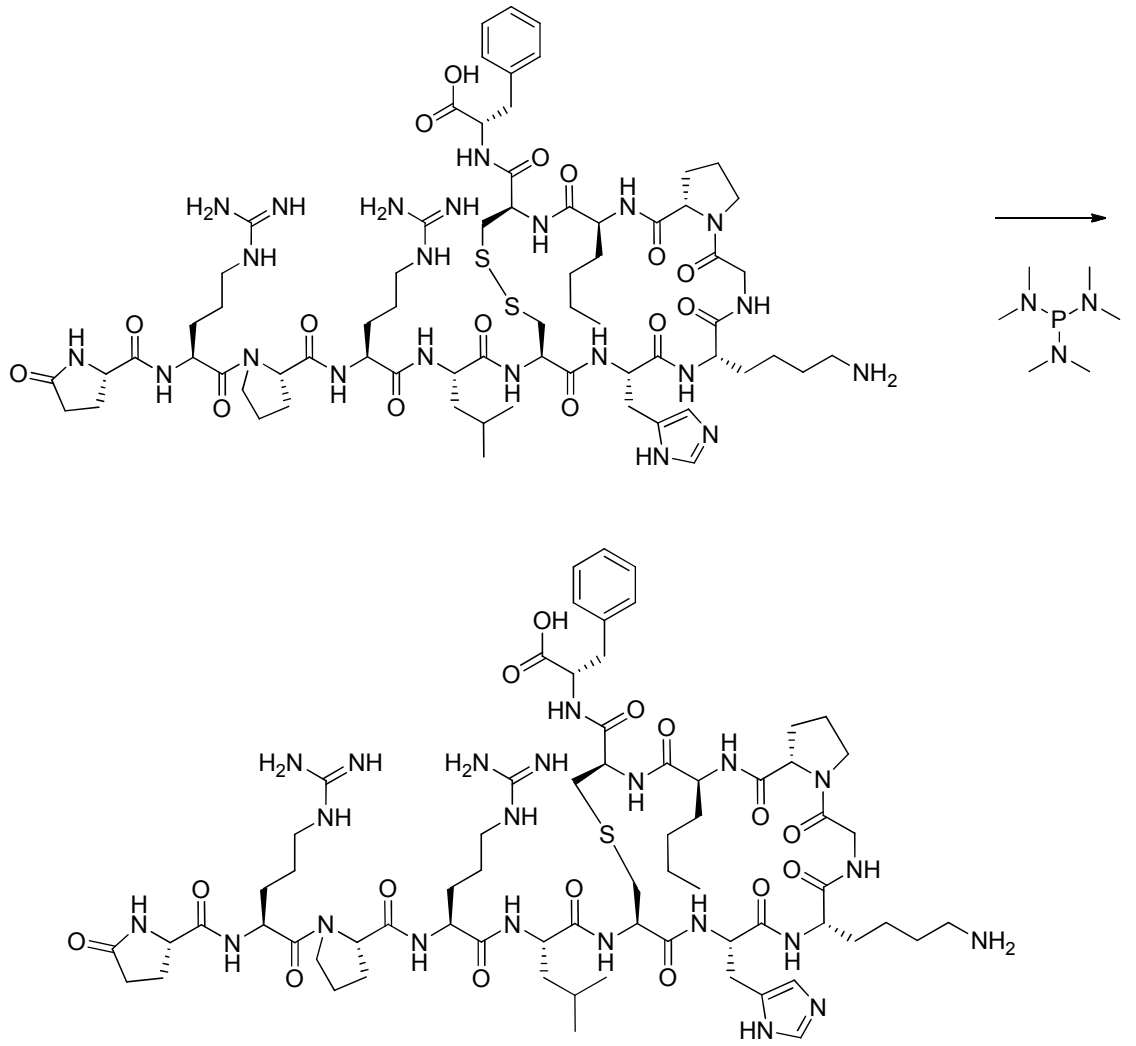
Gradiente: Del 2 al 98 por ciento de B en 4.4 minutos – Flujo de 1.0 mililitro/minuto. Columna : Acquity CSH 1.7 micras, 2.1*50 milímetros, 50°C.



El Ejemplo 8 (ácido (S)-2-((3S,6R,11R,14S,17S,25aS)-14-((1H-imidazol-5-il)-metil)-17-(4-amino-butil)-3-butil-11-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxo-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanoil)-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metil-pentanamido)-1,4,12,15,18,21-hexaoxodocosahidro-1H-pirrolo-[2,1-j][1,2,5,8,11,14,17,20]-ditiahexa-azaciclotricosin-6-

carboxamido)-3-fenil-propanoico) (12 miligramos, 6.76 micromoles) se disolvió en regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH de 6.5 (1.5 mililitros), al cual se le agregó TCEP HCl ((*tris-(*2-carboxi-etil)-fosfina) (2.91 miligramos, 10.13 micromoles), a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. A la solución anterior se le agregó 1,3-dicloro-propan-2-ona (4.29 miligramos, 0.034 milimoles), a temperatura ambiente, la cual se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La RP-HPLC eluyendo del 15 al 60 por ciento de MeCN/agua con ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento, dio el Ejemplo 64 (ácido (S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-il)-metil)-20-(4-amino-butil)-3-butil-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxo-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanoil)-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metil-pentanamido)-1,4,10,15,18,21,24-heptaoxo-hexacosahidro-pirrolo-[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]-ditiahexa-azaciclohexacosin-6-carboxamido)-3-fenil-propanoico) (6 miligramos, 2.93 micromoles, 43.4 por ciento de rendimiento). HRMS (método D) [M+1]; 1590.7911 (observada), 1590.7912 (esperada). Tiempo de retención; 3.08 minutos.

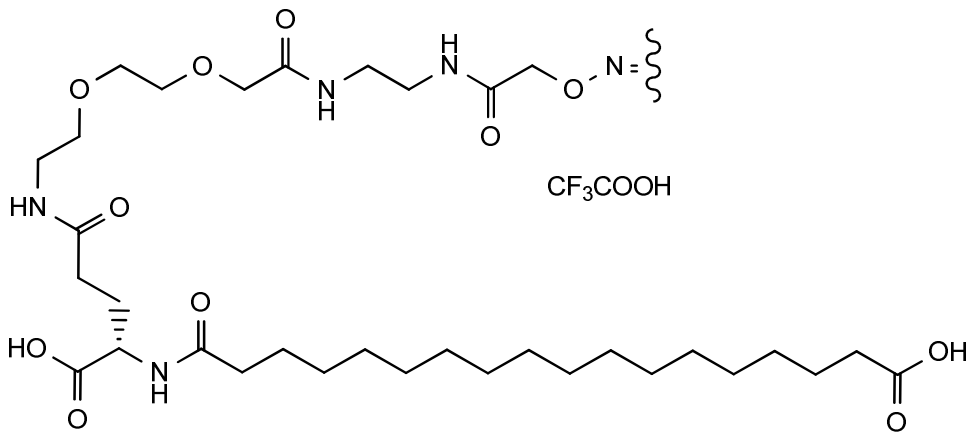
Ejemplo 65: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* (SEQ ID NO: 72) con un enlace de monosulfuro entre las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 [C^{6}-C^{12}]



La mezcla del Ejemplo 8 (ácido (S)-2-((3S,6R,11R,14S,17S, 25aS)-14-((1H-imidazol-5-il)-metil)-17-(4-amino-butil)-3-butil-11-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxo-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanoil)-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metil-pentanamido)-1,4,12,15,18,21-hexaoxodocosahidro-1H-pirrolo-[2,1-j][1,2,5,8,11,14,17,20]-ditiahexa-azaciclotricosin-6-carboxamido)-3-fenil-propanoico, sales de ácido trifluoro-acético (TFA)) (30 miligramos, 0.15 milimoles), y N,N,N',N',N'',N''-hexametil-

fosfinatriamina (12.3 miligramos, 0.75 milimoles) en regulador de suero regulado con fosfato, pH de 9.2 (1 mililitro), se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC de preparación (Sunfire C18, ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento en agua/MeCN) dos veces, y la fracción del producto se liofilizó hasta obtener un polvo blanco (Ejemplo 65: 4 miligramos, 13.4 por ciento). [M+2H]2+ (calculado) = 752.88, [M+2H]2+ (medido) = 752.40, [M+3H]3+ (calculado) = 502.26, [M+3H]3+ (medido) = 501.94. HPLC (método analítico C), Tr min = 6.93.

Ejemplo 66: *pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* (SEQ ID NO: 73) con un enlace de $–S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-$ entre las 2 cisteínas en las posiciones 6 y 12 [C^6-C^{12}], y Z es:

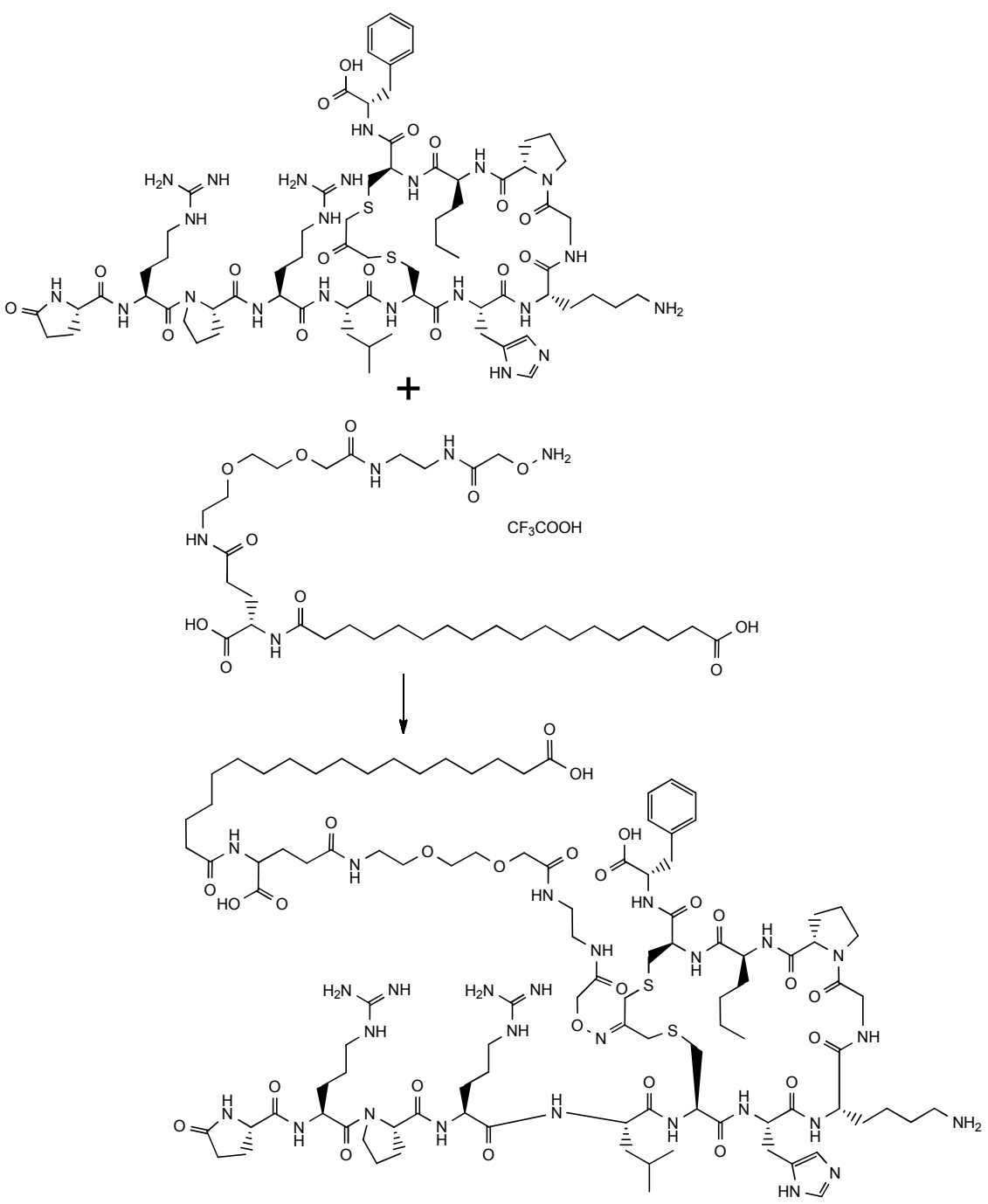


Método analítico

Método D (HRMS);

Eluyente A: agua + ácido fórmico al 0.05 por ciento + acetato de amonio 3.75 mM, Eluyente B: Acetonitrilo + ácido fórmico al 0.04 por ciento.

Gradiente: Del 2 al 98 por ciento de B en 4.4 minutos – Flujo de 1.0 mililitro/minuto. Columna: Acquity CSH 1.7 micras, 2.1*50 milímetros, 50°C.



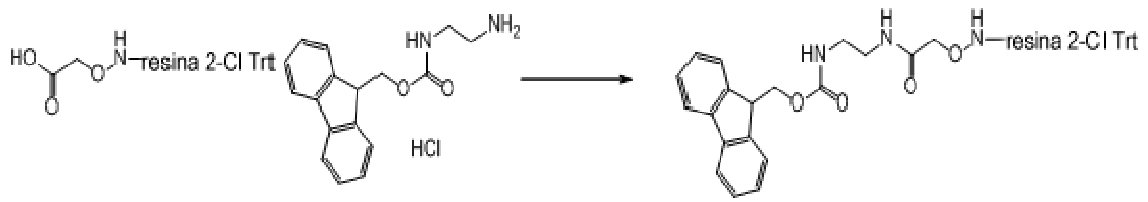
A una solución del Ejemplo 64 (ácido (S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-il)-metil)-20-(4-amino-butil)-3-butil-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxo-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanoil)-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metil-pentanamido)-1,4,10,15,18,21,24-heptaoxo-hexacosahidro-pirrolo-[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]-ditiahexa-azaciclohexacosin-6-carboxamido)-3-fenil-propanoico) (11.5 miligramos, 5.62 micromoles), y el compuesto de ácido (S)-1-(amino-oxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetra-aza-octatriacontan-38-oico con 2,2,2-ácido trifluoro-acético (1:1) (9.19 miligramos, 0.011 milimoles) en regulador de fosfato de sodio 100nM, pH de 6.0 (1 mililitro), se le agregó anilina (2.051 microlitros, 0.022 milimoles), a temperatura ambiente. La adición de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (50 microlitros) dio una solución homogénea. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La RP-HPLC eluyendo con el 15 al 60 por ciento de MeCN/agua con ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento, dio el Ejemplo 66 (ácido 1-((Z)((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-il)-metil)-20-(4-amino-butil)-3-butil-6-((S)-1-carboxi-2-fenil-etil-carbamoil)-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxo-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanoil)-pirrolidin-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metil-pentanamido)-1,4,15,18,21,24-hexaoxodocosahidro-pirrolo-[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]-ditiahexa-azaciclohexacosin-10(1H,9H,11H)-iliden)-amino-oxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-

3,6,15,20-tetra-aza-octatriacontan-38-oico) (4.5 miligramos, 1.646 micromoles, 29.3 por ciento de rendimiento). HRMS (método D) [(M+3)/3]; 759.7487 (observada), 759.7462 (esperada). Tiempo de retención; 4.12 minutos.

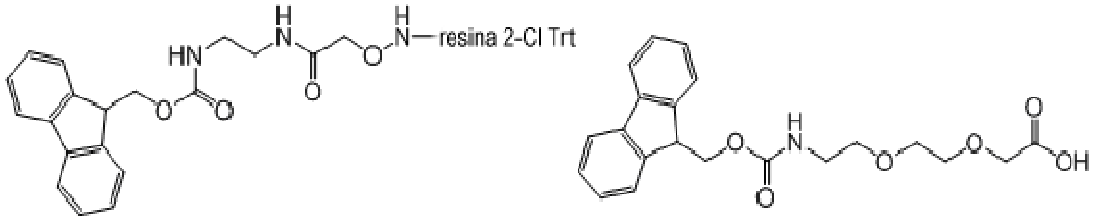
Síntesis del compuesto de ácido (S)-1-(amino-oxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetra-aza-octatriacontan-38-oico con 2,2,2-ácido trifluoro-acético (TFA) (1:1):

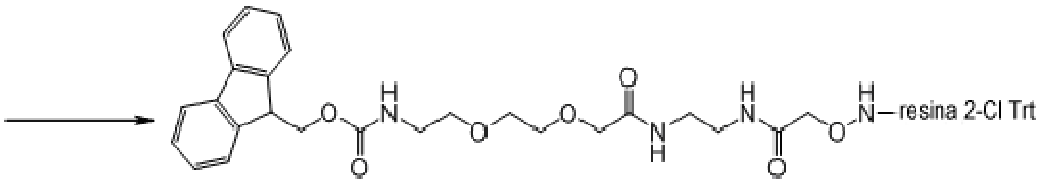


La resina de cloruro de 1-cloro-tritilo (1.55 milimoles/gramo) (0.500 gramos, 0.775 milimoles) en un recipiente de vidrio de 100 mililitros se hinchó en dicloro-metano (DCM) (20 mililitros) durante 30 minutos, y se drenó. Se agregó a la resina una suspensión de hemiclorhidrato de ácido 2-(amino-oxi)-acético (0.338 gramos, 3.10 milimoles), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (1.354 mililitros, 7.75 milimoles) en NMP (7 mililitros)/DCM (4 mililitros), la cual se agitó durante 5 horas. El solvente se drenó. La resina se enjuagó con dicloro-metano (DCM)/MeOH/DIPEA (17/2/1, 40 mililitros), DCM (50 mililitros), NMP (50 mililitros) DCM (50 mililitros), respectivamente. La resina resultante se secó con KOH/NaOH durante la noche.



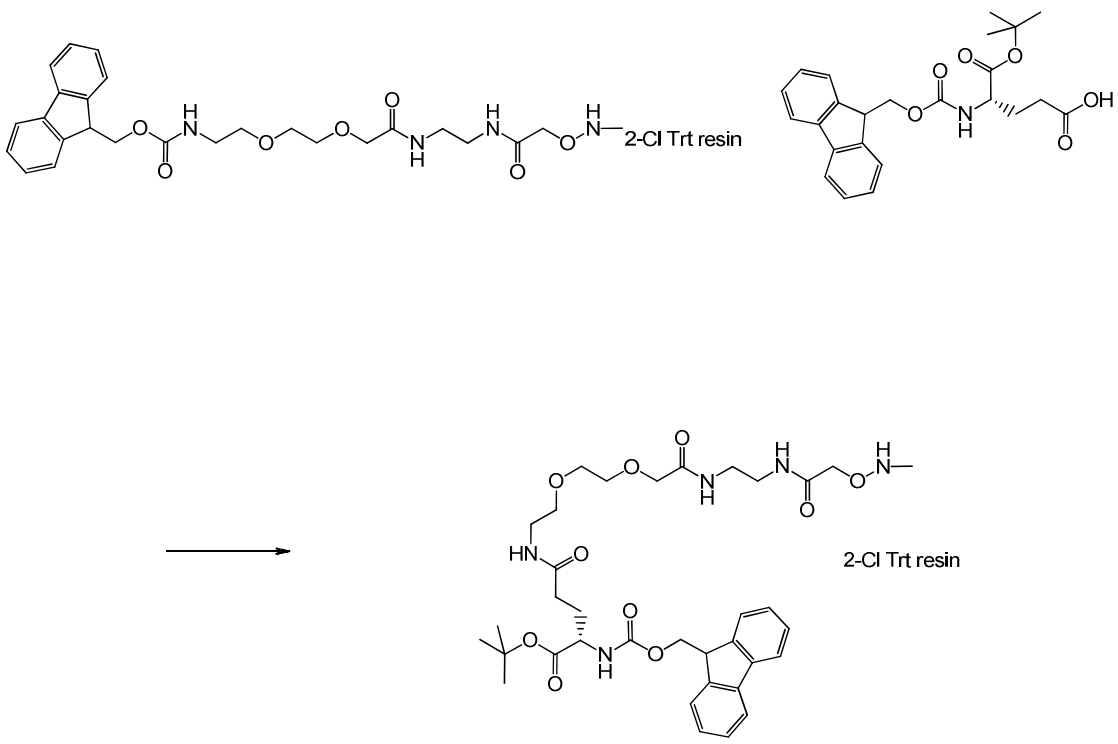
La resina (0.775 milimoles) en un recipiente de vidrio de 100 mililitros se hinchó en dicloro-metano (DCM) (20 mililitros) durante 30 minutos, y se drenó. A una suspensión del clorhidrato de 2-amino-etil-carbamato de (9H-fluoren-9-il)-metilo (0.081 gramos, 0.775 milimoles), HOAt (0.422 gramos, 3.10 milimoles), y di-isopropil-etil-amina (DIPEA) (1.354 mililitros, 7.75 milimoles) en NMP (8 mililitros), se le agregó HBTU (1.176 gramos, 3.10 milimoles) en NMP (2.5 mililitros), el cual se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El solvente se drenó. La resina se enjuagó con NMP (10 mililitros), y DCM (10 mililitros), respectivamente. La resina resultante se secó durante la noche.





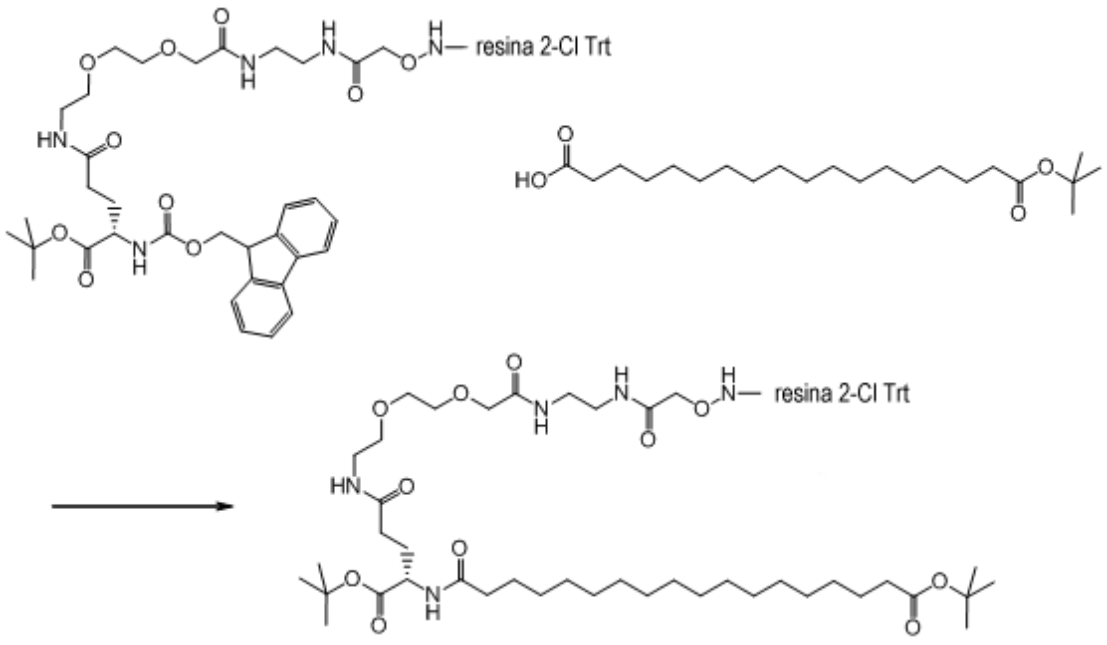
La resina (0.775 milimoles) se cargó en un recipiente de reacción. Se agregaron a la resina 10 mililitros de PIPERIDINA al 20 por ciento / NMP, cuya suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de que se drenó el solvente, se agregaron 10 mililitros adicionales de PIPERIDINA al 20 por ciento /

NMP, y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a la resina una solución de HOAt (0.316 gramos, 2.325 milimoles) y ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-aza-dodecan-12-oico (0.896 gramos, 2.325 milimoles) en NMP (8 mililitros), y se agregó DIC (0.362 mililitros, 2.325 milimoles) en NMP (1 mililitro). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y se enjuagó con NMP (10 mililitros) cuatro veces. La resina resultante se secó durante la noche.



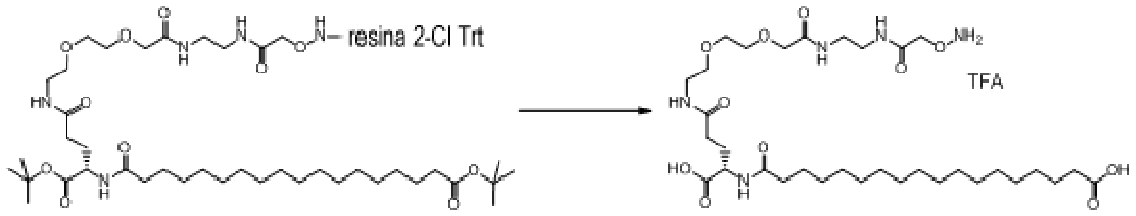
La resina (0.775 milimoles) se cargó en un recipiente de reacción. Se agregaron a la resina 10 mililitros de PIPERIDINA al 20 por ciento / NMP, cuya suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de que se drenó el solvente, se

agregaron 10 mililitros adicionales de PIPERIDINA al 20 por ciento / NMP, y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a la resina una solución de HOAt (0.316 gramos, 2.325 milimoles) y Fmoc-Glu-OtBu (0.989 gramos, 2.325 milimoles) en NMP (8 mililitros), se agregó DIC (0.362 mililitros, 2.325 milimoles) en NMP (2.00 mililitros). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y se enjuagó con NMP (10 mililitros) cuatro veces. La resina resultante se secó durante la noche.



La resina (0.775 milimoles) se cargó en un recipiente de reacción. Se agregaron a la resina 10 mililitros de PIPERIDINA al 20 por ciento / NMP (0.775 milimoles), cuya suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de que se drenó el solvente, se agregaron 10 mililitros adicionales de PIPERIDINA al

20 por ciento / NMP (0.775 milimoles) (0.775 milimoles), y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a la resina una solución de ácido 18-terbutoxi-18-oxo-octadecanoico (0.862 gramos, 2.325 milimoles) y HOAt (0.316 gramos, 2.325 milimoles) en NMP (8 mililitros), y se agregó DIC (0.362 mililitros, 2.325 milimoles) en NMP (2.00 mililitros). La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y se enjuagó con NMP (10 mililitros) cuatro veces. La resina resultante se secó durante la noche.



La resina (0.775 milimoles) se trató con 20 mililitros de cóctel de disociación (TFA/TIPS/agua = 95/2.5/2.5) durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La resina se removió mediante filtración, y se enjuagó con ácido trifluoro-acético (TFA). El filtrado se concentró al vacío. La RP-HPLC con una columna C18, eluyendo con el 15 al 50 por ciento de MeCN / agua con ácido trifluoro-acético (TFA) al 0.1 por ciento, dio el ácido (S)-1-(amino-oxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetra-aza-octatriacontan-38-oico con 2,2,2-ácido trifluoro-acético (TFA) (1:1) (207 miligramos, 0.294 milimoles, 37.9 por ciento de rendimiento). HRMS (método D) [M+1]; 704.4459 (observada), 704.4486 (esperada). Tiempo de retención; 2.63 minutos.

Los polipéptidos de los Ejemplos 1 a 66 se pueden purificar y aislar como se describe anteriormente y/o mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con solvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos y recristalización. Cuando el polipéptido aislado en los ejemplos anteriores es un compuesto libre, se puede convertir hasta una sal adecuada mediante el método conocido. Por consiguiente, los péptidos de los Ejemplos 1 a 66 se pueden convertir en su sal correspondiente (por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, citrato, acetato, lactato u otra sal farmacéutica adecuada para inyección) con una proporción del polipéptido:sal en el intervalo de 1:1 a 1:4. Por ejemplo, los polipéptidos de los Ejemplos 1 a 66 se pueden disolver en agua, y se pueden convertir en una sal utilizando resinas de intercambio de iones. Inversamente, cuando el péptido aislado es una sal, se puede convertir hasta el péptido libre mediante un método conocido, o directamente hasta una sal diferente con la ayuda de resinas de intercambio de iones.

Se ha encontrado que los polipéptidos de los siguientes Ejemplos tienen valores EC_{50} en el intervalo de aproximadamente 0.01 nM a aproximadamente 1,100 nM para la potencia del receptor de APJ. Se ha encontrado que los polipéptidos de los siguientes Ejemplos tienen una estabilidad en plasma mayor de 2 minutos, mayor de 5 minutos, mayor de 10 minutos, mayor de 20 minutos, mayor de 50 minutos y mayor de 60 minutos.

Se puede ver que los polipéptidos de la invención son útiles

como agonistas del receptor de APJ y, por consiguiente, son útiles en el tratamiento de enfermedades y condiciones que respondan a la activación del receptor de APJ, tales como las enfermedades que se dan a conocer en la presente.

Habiendo descrito de esta manera las modalidades de ejemplo de la presente invención, debe ser observado por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo que las divulgaciones de la presente son solamente de ejemplo, y que se pueden hacer otras diversas alternativas, adaptaciones, y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. De conformidad con lo anterior, la presente invención no está limitada a las modalidades específicas como se ilustran en la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene la siguiente fórmula I' (SEQ ID NO: 74):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

en donde:

X1 es el término N del polipéptido y está ausente o bien se selecciona a partir de pE, R, Isn, Q, A, K, y ácido 5-amino-valérico;

X2 es R, A, r, N-Me-R, K, H, hF, hK, F, E u Orn;

X3 es P, A, a, p, 4-PhP, K, D, ácido pipecólico, o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X4 es R, A, r, N-Me-R, F, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7;

X5 es L, Cha, A, D-L, N-Me-L, K, D, 4-PhF o F;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente, formando cualquiera de un enlace de monosulfuro (-S-), un enlace de disulfuro (-S-S-), o un enlace de amida (-NHC(O)- o -C(O)-NH-), o un enlace de la fórmula –S-CH_2-C(=Z)-CH_2-S-; en donde Z es O, N-O-CH_2C(O)-L^1-R^1 o N-NH-

$CH_2C(O)$-L^1-R^1, en donde R^1 es un derivado de ácido graso, y L^1 es un enlazador que contiene uno o más aminoácidos y/o una o más unidades de –NH-alquileno de 2 a 6 átomos de carbono-NH-;

o de una manera alternativa, X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6;

X7 es H, h, A, N-Me-A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E o cisteína, en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;

X8 es K, k, F, f, A, hF, N-Me-R, E o 4-amino-lsn;

X9 es G, N-Me-G, A, D, L, R o Aib;

X10 es P, A, p, 4-PhP o ácido pipecólico,

X11 es M, D-Nle, Nle, N-Me-Nle, M(O), A, F y, L, K, 3-PyA o Cha; y

X13 es el término C y está ausente o se selecciona a partir de F, f, N-Me-F, Nal, D-Nal, 3-Br-F, (S)-ß-3-F, I, A, a, K, Dap, H y E;

en donde:

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-naftilalanina;

Orn es ornitina;

Aib es ácido α-amino-isobutírico;

Dab es ácido (S)-diamino-butírico;

Dap es ácido (S)-2,3-diamino-propiónico;

M(O) es metionina-sulfona;

Cha es (S)-ß-ciclohexilalanina;

4-amino-Isn es ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico;

Isn es isonipecotinoílo;

pE es ácido L-piroglutámico;

3-PyA es 3-(3-piridil)-L-alanina;

4-PhF es 4-fenil-L-fenilalanina;

en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y

en donde el grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn se enlaza opcionalmente a un grupo lipofílico por medio de un enlace de amida;

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

2. Un polipéptido que tiene la siguiente fórmula (SEQ ID NO: 75):

X1-R-P-R-X5-X6-X7-X8-X9-P-X11-X12-X13 II

X1 está ausente, o es pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

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

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

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

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o innatural seleccionado a partir de C, c, hc, D-hc, K, D, Orn, Dab o E, en donde las cadenas laterales de X6 y X12 se enlazan entre sí por medio de un enlace covalente, formando ya sea un enlace de disulfuro o de amida; y en donde el término N y el término C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a los mismos.

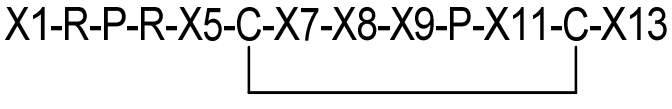
3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde (SEQ ID NO: 76):

X6 y X12 se seleccionan independientemente a partir de K, Orn, Dab, E y D, y en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas un enlace de amida; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde (SEQ ID NO: 77):

X6 y X12 son independientemente C en donde las cadenas laterales de X6 y X12 forman juntas un enlace de disulfuro; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

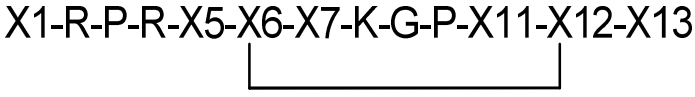
5. El polipéptido de la reivindicación 1, 2 o 4, el cual tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 78):



III;

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

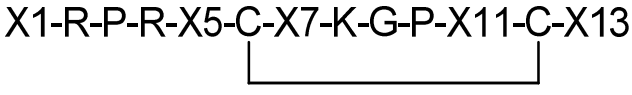
6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el cual tiene la fórmula IV (SEQ ID NO: 79):



IV;

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

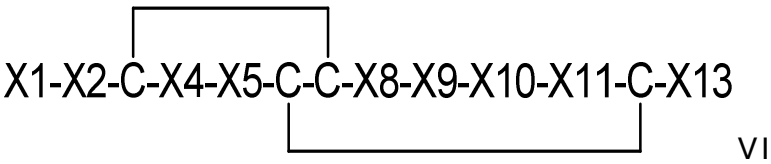
7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 6, el cual tiene la fórmula V (SEQ ID NO: 80):



V;

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

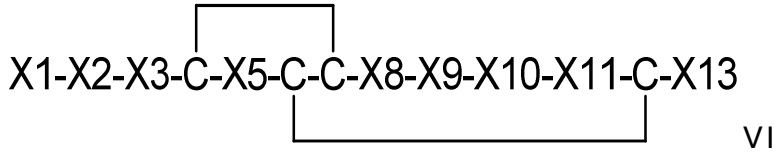
8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene la fórmula VI (SEQ ID NO: 81):



VI

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

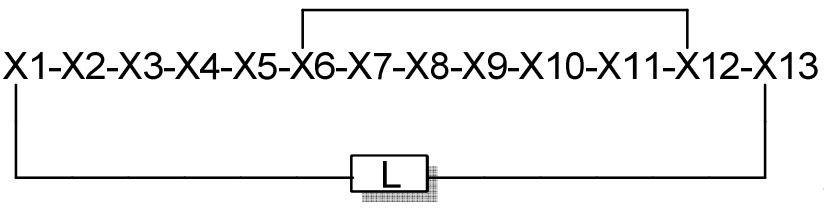
9. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, el cual tiene la fórmula VII (SEQ ID NO: 82):



VII

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

10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 5, 6 o 7, el cual tiene la fórmula VIII (SEQ ID NO: 83):



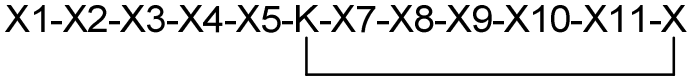
VIII

en donde el término N de X1 y el término C de X13 forman un anillo junto con un enlazador L;

y en donde L es (G)r, G es glicina, y r es 1, 2, 3 o 4; o una sal del polipéptido.

11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, en donde X1 es Q, X13 es F, y r es 2 (SEQ ID NO: 84); o una sal del polipéptido.

12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X6 es K, X13 está ausente, y X12 es F o f, en donde el término C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral de amino de X6; y el cual tiene la fórmula IX (SEQ ID NO: 85):



IX,

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

13. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, en donde X1 es pE (SEQ ID NO: 86); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

14. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 9 y 12, en donde X1 está ausente (SEQ ID NO: 87); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

15. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el término N es una amida; o una sal del polipéptido.

16. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el término N es una amida de la fórmula –NHR, y R es acetilo, benzoílo, fenacilo, succinilo, octanoílo, 4-fenil-butanoílo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; o una sal del polipéptido.

17. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, en donde el término N es una amida de la fórmula NHR1, en donde R1 es $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-C(O)-, Palmitoílo$(O2Oc)_p$, Miristoílo$(O2Oc)_p$, Lauroílo$(O2Oc)_p$ o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; y en donde:

p es un entero de 1 a 4;

m es un entero de 1 a 12;

Lauroílo(O2Oc) es $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Miristoílo(O2Oc) es $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Palmitoílo(O2Oc) es $C_{15}H_{31}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

o una sal del polipéptido

18. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde X13 es F (SEQ ID NO: 88); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

19. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde X13 está ausente (SEQ ID NO: 89); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

20. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el término C es una amida; o una sal del polipéptido.

21. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el término C es una amida de la fórmula –C(O)-R2, y R2 es $-NH_2$, -NH-Me, -NH-NHBn, o $-NH-(CH_2)_2$-Ph; o una sal del polipéptido.

22. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde X5 es L (SEQ ID NO: 90); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

23. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 10 a 22, en donde X7 es H (SEQ ID NO: 91); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

24. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 23, en donde X8 es K (SEQ ID NO: 92); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

25. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 24, en donde X9 es G (SEQ ID NO: 93); o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

26. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde X11 es Nle (SEQ ID NO: 94), o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

27. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1,

seleccionado a partir de:

*p*E-R-P-R-L-K*-H-F-G-P-Nle-D*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 8),

*p*E-R-P-R-L-K*-H-F-G-P-Nle-E*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 9),

*p*E-R-P-R-L-Orn*-H-F-G-P-Nle-D*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 10),

*p*E-R-P-R-L-Dab*-H-F-G-P-Nle-D*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 11),

*p*E-R-P-R-L-K*-F-K-G-P-Nle-F* (SEQ ID NO: 12),

*p*E-R-P-R-L-K*-F-K-G-P-Nle-f* (SEQ ID NO: 13),

Q-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-G-G (SEQ ID NO: 14),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 15),

*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 16),

*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 17),

H-Isn-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 18),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 19),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 20),

pE-R-P-R-Cha-C*-H-K-G-P-Cha-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 21),

*p*E-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 22),

H-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 23),

H-R-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 24),

H-Isn-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 25),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-F-G-P-Nle-C*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 26),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-Aib-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 27),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 28),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-K(Palmitoil)-*OH* (SEQ ID NO: 29),

*p*E-R-P-R-L-C*-K(Palmitoil)-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 30),

Palmitoil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 31),

Lauroil-O2Oc-Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 32),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-K(Lauroil)-*OH* (SEQ ID NO: 33),

*p*E-R-P-R-L-C*-K(Lauroil)-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 34),

*p*E-R-P-C**-L-C*-C**-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 35),

*p*E-R-C**-R-L-C*-C**-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 36);

*p*E-r-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 37);

*p*E-F-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 38)*;*

*p*E-E-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 39)*;*

*p*E-R-p-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 40)*;*

*p*E-R-K-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 41)*;*

*p*E-R-D-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 42)*;*

*p*E-R-P-F-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 43)*;*

*p*E-R-P-R-K-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 44)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-E-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 45)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-D-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 46)*;*

*p*E-R-P-E-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 47)*;*

*p*E-R-P-R-(4-PhF)-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 48)*;*

*p*E-R-P-R-D-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 49)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-E-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 50)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-L-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 51)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-R-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 52)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-(Ácido pipecólico)-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 53)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(3-PyA)-C-F-*OH* (SEQ ID NO: 54)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-H-*OH* (SEQ ID NO: 55)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-E-*OH* (SEQ ID NO: 56)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-*NH_2* (SEQ ID NO: 70)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*NH_2* (SEQ ID NO: 69)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-*OH* (SEQ ID NO: 57)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-*h*C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 58)*;*

*p*E-R-P-R-L-*h*C*-H-K-G-P-Nle-*h*C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 59)*;*

*p*E-R-P-R-L-c*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 60)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)*-F-*OH* (SEQ ID NO: 61)*;*

*p*E-R-P-R-L-(D-*h*C)*-H-K-G-P-Nle-(D-*h*C)*-F-*OH* (SEQ ID NO: 62)*;*

MiristoíloO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 65)*;*

MiristoíloO2OcO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 66)*;*

MiristoíloO2OcO2OcO2OcO2OcQ-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C-f-*OH* (SEQ ID NO: 67)*;*

*p*E-R-P-R-L-C*H-K-G-P-Nle-c*-F-*OH* (SEQ ID NO: 63)*;*

*p*E-R-P-R-L-c*-H-K-G-P-Nle-c*-F-*OH* (SEQ ID NO: 64)*; y*

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K(Myr)-G-P-Nle-C*-F-OH (SEQ ID NO: 68).

*pE-R-P-R-L-C***-H-K-G-P-Nle-C***-F-OH* (SEQ ID NO: 71)

en donde los dos aminoácidos marcados con "*" representan los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o de amida por medio de su cadena lateral o de su término, respectivamente, y en donde los dos aminoácidos marcados con "**" representan los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro por medio de su cadena lateral o un enlace de amida por medio de sus

términos; y en donde los 2 aminoácidos marcados con "***" representan los aminoácidos que forman un enlace de monosulfuro o un enlace de –S-CH_2-C(O)-CH_2-S- por medio de su cadena lateral; o una amida, un éster, o una sal del polipéptido.

28. El polipéptido de la reivindicación 27, seleccionado a partir de:

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 15),

*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 16),

*p*E-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 17),

H-Isn-R-P-R-L-C*-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 18),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 19),

*p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-f-*OH* (SEQ ID NO: 20),

pE-R-P-R-Cha-C*-H-K-G-P-Cha-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 21),

*p*E-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 22),

H-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 23),

H-R-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 24),

H-Isn-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-*OH* (SEQ ID NO: 25), y

*p*E-R-P-R-L-C*-H-F-G-P-Nle-C*-fenetil-amina (SEQ ID NO: 26);

en donde las cadenas laterales de los 2 aminoácidos de cisteína C* forman juntas un enlace de disulfuro; o una amida, un

éster, o una sal del polipéptido.

29. Un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de un trastorno que responda al agonismo del receptor de APJ, en un sujeto que lo necesite, el cual comprende administrar al sujeto, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo.

30. El método de la reivindicación 29, en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona a partir de:

insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia.

31. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo, para utilizarse como un medicamento.

32. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo, para utilizarse en el tratamiento o en la prevención de una

enfermedad o de un trastorno que responda al agonismo del receptor de APJ.

33. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo, para utilizarse en el tratamiento de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol) o preeclampsia.

34. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo, y uno o más co-agentes terapéuticamente activos.

35. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 34, en donde el co-agente se selecciona a partir de inótropos, bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de HMG-Co-A-reductasa, antagonistas de los receptores de angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE),

bloqueadores del canal de calcio (CCB), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de los receptores de aldosterona, bloqueadores de los receptores de endotelina, inhibidores de la sintasa de aldosterona (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y/o un inhibidor de NEP..

36. Una composición farmacéutica, la cual comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, o una amida, un éster o una sal del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

RESUMEN

La invención proporciona un polipéptido sintético de la fórmula I':

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I'

o una amida, un éster o una sal del mismo, en donde X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12 y X13 se definen en la presente. Los polipéptidos son agonistas del receptor de APJ. La invención también se refiere a un método para la elaboración de los polipéptidos de la invención, y sus usos terapéuticos, tales como el tratamiento o la prevención de insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, ateroesclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad de arterias periféricas, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol), y preeclampsia. La presente invención proporciona además una combinación de agentes farmacológicamente activos y una composición farmacéutica.

* * * * *

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> MIMÉTICOS DE APELINA SINTÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA

<130> PAT054961-WO-PCT

<140> PCT/IB2013/050666

<141> 2013-01-25

<150> 61/731,697

<151> 2012-11-30

<150> 61/717,760

<151> 2012-10-24

<150> 61/591,557

<151> 2012-01-27

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Gln" o "Isn" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "Aib" o "Phe" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "Phe" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "Aib"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 1

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys (Palmitoílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Lauroílo)" o "ácido 5-amino-valérico" o "Lys" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys(Palmitoílo)" o "3-PyA" o "Cha" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "Lys(O2Oc-Palmitoílo)" o "Dap(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 2

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys (Palmitoílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Lauroílo)" o "ácido 5-amino-valérico" o "Lys" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys(Palmitoílo)" o "3-PyA" o "Cha" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "Lys(O2Oc-Palmitoílo)" o "Dap(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 3

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys (Palmitoílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Lauroílo)" o "ácido 5-amino-valérico" o "Lys" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys(Palmitoílo)" o "3-PyA" o "Cha" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "Lys(O2Oc-Palmitoílo)" o "Dap(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 4

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys (Palmitoílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Lauroílo)" o "ácido 5-amino-valérico" o "Lys" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe"

o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg"

o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala"

o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys(Palmitoílo)" o "3-PyA"

o "Cha" o "Lys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o

"3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala"

o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o

"Lys(Miristoílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "Lys(O2Oc-Palmitoílo)" o "Dap(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 5

Arg Arg Cys Arg Leu Cys Cys Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys

(Palmitoílo)" o "Lys(Miristoílo)" o "Lys(Lauroílo)" o "ácido 5-amino-valérico" o "Lys" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg"
o "Aib"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala"
o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys(Palmitoílo)" o "3-PyA"
o "Cha" o "Lys"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o
"3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala"
o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o
"Lys(Miristoílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o
<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar = "Lys(O2Oc-Palmitoílo)" o "Dap(Palmitoílo)" o " "
<220>
<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 6

Arg Arg Pro Cys Leu Cys Cys Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 7

Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu

1 5 10 15

Ala Phe

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 8

Glu Arg Pro Arg Leu Lys His Phe Gly Pro Leu Asp

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 9

Glu Arg Pro Arg Leu Lys His Phe Gly Pro Leu Glu

1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> on

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 10

Glu Arg Pro Arg Leu Xaa His Phe Gly Pro Leu Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Dab

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 11

Glu Arg Pro Arg Leu Xaa His Phe Gly Pro Leu Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 12

Glu Arg Pro Arg Leu Lys Phe Lys Gly Pro Leu Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Phe

<400> 13

Glu Arg Pro Arg Leu Lys Phe Lys Gly Pro Leu Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 14

Gln Arg Pro Arg Leu Cys Phe Lys Gly Pro Leu Cys Phe Gly Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 15

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 16

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Xaa Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 17

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Xaa Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Isn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 18

Xaa Arg Pro Arg Leu Cys Xaa Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 19

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> D-Phe

<400> 20

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Cha

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Cha

<400> 21

Glu Arg Pro Arg Xaa Cys His Lys Gly Pro Xaa Cys Phe

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 22

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Phe Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Nle

<400> 23

Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 24

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Isn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 25

Xaa Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 26

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Phe Gly Pro Leu Cys

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 27

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Xaa Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> 4-NH-Isn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 28

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Xaa Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 29

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 30

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Lys Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Nle

<400> 31

Xaa Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Nle

<400> 32

Xaa Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 33

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 34

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Lys Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 35

Glu Arg Pro Cys Leu Cys Cys Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 36

Glu Arg Cys Arg Leu Cys Cys Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> D-Arg

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 37

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 38

Glu Phe Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 39

Glu Glu Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> D-Pro

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 40

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 41

Glu Arg Lys Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 42

Glu Arg Asp Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 43

Glu Arg Pro Phe Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 44

Glu Arg Pro Arg Lys Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 45

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Glu Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 46

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Asp Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 47

Glu Arg Pro Glu Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 4-PhF

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 48

Glu Arg Pro Arg Phe Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 49

Glu Arg Pro Arg Asp Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 50

Glu Arg Pro Arg Leu Cys Glu Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 51

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Leu Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 52

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Arg Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Ácido pipecólico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 53

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Xaa Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> 3-PyA

<400> 54

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Ala Cys Phe

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 55

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys His

1 5 10

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 56

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Glu

1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 57

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys

1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> homoCys

<400> 58

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> homoCys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> homoCys

<400> 59

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> D-Cys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 60

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-homoCys

<400> 61

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> D-homoCys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-homoCys

<400> 62

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Cys

<400> 63

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> D-Cys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> D-Cys

<400> 64

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> D-Phe

<400> 65

Xaa Xaa Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10 15

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> D-Phe

<400> 66

Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10 15

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> O2Oc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Nle

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> D-Phe

<400> 67

Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys

1 5 10 15

Phe

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 68

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 69

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 70

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys

1 5 10

<210> 71

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 71

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 72

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<400> 73

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 74

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Gln" o "Isn" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"

o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "Aib" o "Phe" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "Phe" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "Aib"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 75

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Asp"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Asp"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 76

Arg Arg Pro Arg Leu Lys His Lys Gly Pro Met Lys Phe
1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA"

o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 77

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 78

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 79

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 80

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o

"N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen

preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 81

Arg Arg Cys Arg Leu Cys Cys Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o

"Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 82

Arg Arg Pro Cys Leu Cys Cys Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(17)

<223> /reemplazar = " "

<220>

<221> características_varias

<222> (14)..(17)

<223> /nota = "Esta región puede abarcar 1, 2, 3 o 4 residuos"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(17)

<223> /nota = "Péptido cíclico"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(17)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 83

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu"

o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o

"Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"
o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(15)

<223> /nota = "Péptido cíclico"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(15)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 84

Gln Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe Gly Gly
1 5 10 15

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Phe"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(12)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 85

Arg Arg Pro Arg Leu Lys His Lys Gly Pro Met Phe

1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> PyroGlu

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"
o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o
"3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o
"D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o
"Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones
para las posiciones variantes"

<400> 86

Glu Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"

o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o

"Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o

"Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe"

o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg"

o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(12)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 87

Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe"
o "Glu" o "Cys"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o
"Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"
o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o
"Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o
"Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe"
o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"
<220>
<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg"
o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o
"Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA"
o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"
o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones
para las posiciones variantes"

<400> 88

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o
"Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o
"His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o
"Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220> <221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(12)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 89

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys

1 5 10

<210> 90

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys"
o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His"
o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys"
o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu"

o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o

"Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o

"Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o

"Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o

"homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o

"Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 90

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 91

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 91

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe

1 5 10

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys"

o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o
"3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o
"D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o
"Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones
para las posiciones variantes"

<400> 92

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o
"Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"

o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)

<223> /reemplazar = "D-Nle" o "Nle" o "N-Me-Nle" o "M(O)" o "Ala" o "Phe" o "Tyr" o "Leu" o "Lys" o "3-PyA" o "Cha"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys"
o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o
"3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o
"D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o
"Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "
<220>
<221> características_varias
<222> (1)..(13)
<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones
para las posiciones variantes"
<400> 93
Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Met Cys Phe
1 5 10
<210> 94
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar = "PyroGlu" o "Isn" o "Gln" o "Ala" o "Lys" o "ácido 5-amino-valérico" o " "

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Lys" o "His" o "homoPhe" o "HomoLys" o "Phe" o "Glu" o "Orn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "Lys" o "Asp" o "ácido pipecólico" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Arg" o "N-Me-Arg" o "Phe" o "Glu" o "Cys"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /reemplazar = "Cha" o "Ala" o "D-Leu" o "N-Me-Leu" o "Lys" o "Asp" o "4-PhF" o "Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "D-His" o "Ala" o "N-Me-Ala" o "D-Ala" o "Aib" o "Lys" o "Nal" o "Phe" o "Pro" o "Dap" o "Asn" o "Glu" o "Cys" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar = "D-Lys" o "Phe" o "D-Phe" o "Ala" o "homoPhe" o "N-Me-Arg" o "Glu" o "4-amino-Isn"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> /reemplazar = "N-Me-Gly" o "Ala" o "Asp" o "Leu" o "Arg" o "Aib"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "Ala" o "D-Pro" o "4-PhP" o "ácido pipecólico"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Nle

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> /reemplazar = "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys" o "Lys" o "Asp" o "Orn" o "Dab" o "Glu" o "Phe" o "D-Phe"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> /reemplazar = "D-Phe" o "N-Me-Phe" o "Nal" o "D-Nal" o "3-Br-Phe" o "(S)-Beta-3-Phe" o "Ile" o "Ala" o "D-Ala" o "Lys" o "Dap" o "His" o "Glu" o "Lys(Lauroílo)" o "Lys(Palmitoílo)" o " "

<220>

<221> características_varias

<222> (1)..(13)

<223> /nota = "Los residuos variantes dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquéllos de las anotaciones para las posiciones variantes"

<400> 94

Arg Arg Pro Arg Leu Cys His Lys Gly Pro Leu Cys Phe

1 5 10

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 54961-WO-NP	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/IB2013/050666	International filing date *(day/month/year)* 25/01/2013	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 27/01/2012
Applicant NOVARTIS AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2013/050666

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [ ] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [X] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2013/050666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K7/56 C07K14/47 A61K38/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BEILSTEIN Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JURI HAMADA ET AL: "Evaluation of novel cyclic analogues of apelin.", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 22, no. 4, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 547-552, XP055072884, ISSN: 1107-3756 Discussion; figure 1; table 1 ----- -/--	1-36

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 July 2013	12/08/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vogt, Titus

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	N. MACALUSO ET AL.: "Exploring the 'RPRL' Motif of Apelin-13 through Molecular Simulation and Biological Evaluation of Cyclic Peptide Analogues", CHEMMEDCHEM, vol. 5, no. 8, 2 August 2010 (2010-08-02), pages 1247-1253, XP055072887, ISSN: 1860-7179, DOI: 10.1002/cmdc.201000061 figure 1; tables 2,3	1-36
Y	N. MACALUSO ET AL: "Discovery of a Competitive Apelin Receptor (APJ) Antagonist", CHEMMEDCHEM, vol. 6, no. 6, 6 June 2011 (2011-06-06), pages 1017-1023, XP055072896, ISSN: 1860-7179, DOI: 10.1002/cmdc.201100069 figure 2; tables 2,3	1-36
A,P	ALEXANDRE MURZA ET AL: "Elucidation of the Structure-Activity Relationships of Apelin: Influence of Unnatural Amino Acids on Binding, Signaling, and Plasma Stability", CHEMMEDCHEM, vol. 7, no. 2, 6 February 2012 (2012-02-06), pages 318-325, XP55072892, ISSN: 1860-7179, DOI: 10.1002/cmdc.201100492 abstract; tables	1-36
A	SIDOROVA ET AL.: "Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogues", RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY, vol. 38, no. 1, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 40-51, XP002706051, ISSN: 1068-1620, DOI: 10.1134/S1068162012010177 the whole document	1-36