Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	16 25027 0000 0000	2016-02-03 16:28:20	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 729
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	9613	$ 64000	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	**Titulo de la Invención**(200 caractares o espacios máximos)
	POLIPÉPTIDOS CÍCLICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA.

2	**Datos del Solicitante / Titular**			
	Nombre:	NOVARTIS AG	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com
	Dirección:	Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel	**Domicilio/País de constitución:**	SUIZA - BASEL - BASEL
	Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE **Número:** 1044665-			

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
	1. NOVARTIS AG	NN	1044665

4	**Datos del Inventor**			
	Nombre:	Alexandra Marshall BRUCE	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com

Dirección:	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - MASSACHUSETTS - CAMBRIDGE

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE ☒ No Aplica

Número: -

5	Inventor(es)

	Apellidos - Nombres	Domicilio
1.	BRUCE Alexandra Marshall	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2.	GROSCHE Philipp	SUIZA
3.	GUIMARAES Carla	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	KANTER Aaron	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5.	LOU Changgang	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
6.	USERA Aimee Richardson	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7.	YASOSHIMA Kayo	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
8.	YUAN Jun	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
9.	ZECRI Frederic	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
10.	ZHAO Hongjuan	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6	Datos Inventor(es)

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139

2.	SUIZA	BASEL	BASEL	Novartis Pharma AG, Postfach, CH-4002 Basel
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	SOMERVILLE	20 Brastow Ave. Somerville, Massachusetts 02143
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MICHIGAN	PORTAGE	3681 Fawn Cove Lane, Apt. 1 Portage, Michigan 49024
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139
7.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139
8.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	400 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139
9.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Technology Square, Cambridge, Massachusett 02139
10.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	250 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139

7	**Datos del Representante Legal / Apoderado**		
Nombre:	CARLOS R. OLARTE GARCIA	**Dirección Electrónica:**	patents@olartemoure.com
Dirección:	patents@olartemoure.com	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:			

☒ CEDULA DE CIUDADANIA	☐ CEDULA DE EXTRANJERIA		
☐ EMPRESA EXTRANJERA	☐ NIT		
☐ PASAPORTE			
Número:	79782747-		

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	**Datos Solicitud: PCT / WO**		
Número Solicitud:	PCT/US2014/047377	**Fecha Solicitud:**	21/07/2014
Número Publicacion:	WO2015/013168	**Fecha Publicacion:**	29/01/2015

9	**Declaraciones de prioridad**	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	**Codigo del país**	**(31) No. Solicitud**	**(32) Fecha _**
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/858,263	25/07/2013
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	62/015,854	23/06/2014

10	**Reivindicaciones**			
Número reivindicaciones:	38	**Pago Reivindicaciones:**	No	

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen

☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional
☒ Listado de secuencias
☐ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☒ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

POLIPÉPTIDOS CÍCLICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado de manera electrónica en formato ASCII y se incorpora en la presente en su totalidad como referencia. Dicha copia ASCII, creada el 29 de septiembre de 2014, se denomina PAT055418-WO-PCT_SL.txt y tiene 49,524 bytes de tamaño.

LISTADO DE SECUENCIAS

La invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden secuencias de péptidos y polipéptidos modificadas diseñadas para tratar la enfermedad cardiovascular en sujetos a los que se administran, y que presentan una mayor resistencia a la degradación, y con una bioactividad equivalente o mayor que sus homólogos de tipo silvestre. La invención también se refiere a métodos para preparar dichas composiciones y el uso de dichas composiciones como agentes farmacéuticamente activos para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

FUDAMENTO DE LA INVENCIÓN

La incidencia de falla cardiaca en el mundo occidental es aproximadamente 1/100 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, con ello, el gasto cardíaco, es decir, el volumen efectivo de sangre expulsado por cualquier ventrículo del corazón con el tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, insuficiencia del corazón para mantener la circulación sanguínea adecuada, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más. Hay aproximadamente unas quinientas mil hospitalizaciones al año por "insuficiencia cardiaca aguda descompensada" (ICAD), sólo en los EE.UU.

Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos, vasodilatadores e inotrópicos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendan) se utilizan en el contexto agudo, a pesar de

su asociación con eventos adversos como arritmias y aumento de la mortalidad a largo plazo. Estos compromisos han impedido su aplicación en la insuficiencia cardíaca crónica. La digoxina es un fármaco inotrópico oral, pero está limitado por un estrecho margen terapéutico, potencial arritmogénico aumentado y contraindicaciones en caso de insuficiencia renal.

Se necesita con urgencia una terapia para la insuficiencia cardíaca, que aumente la contractilidad cardíaca sin compromisos arritmogénicos o de mortalidad para ICAD, pero que también pueda hacer frente a la enorme necesidad médica no satisfecha en insuficiencia cardíaca crónica.

Apelina es el ligando endógeno del anteriormente receptor huérfano acoplado a proteína G (GPCR), APJ, también conocido como receptor de apelina, receptor de angiotensina similar al tipo 1, receptor de angiotensina similar al tipo 2 y similares. La ruta de apelina/APJ se expresa ampliamente en el sistema cardiovascular y la apelina ha mostrado importantes efectos cardiovasculares beneficiosos en los modelos preclínicos. La administración de apelina aguda en los humanos provoca la vasodilatación periférica y coronaria y aumenta el gasto cardíaco (Circulation.2010; 121:1818-1827). Como un resultado, el agonismo de APJ está emergiendo como una importante diana terapéutica para los pacientes con insuficiencia cardíaca. La activación del receptor de apelina APJ se cree que aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona cardioprotección, sin los compromisos de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben una vida media y duración de acción muy cortas in vivo. La vida media muy corta es una de las principales dificultades reconocidas con la entrega de dichos péptidos endógenos terapéuticos debido a rápida eliminación del suero y degradación proteolítica a través de la acción de peptidasas.

Una forma que se ha utilizado en la actualidad para superar esta desventaja es administrar al paciente grandes dosis del péptido terapéutico de interés, de modo que si incluso algún péptido terapéutico se degradara, quedara suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Sin embargo, este método es incómodo para los pacientes. Como la mayoría de los péptidos terapéuticos no se pueden administrar por vía oral, el péptido terapéutico tendría que ser, bien sea constantemente infundido, infundido con frecuencia por inyección intravenosa o administrado con frecuencia por la ruta inconveniente de inyecciones subcutáneas. La necesidad de una administración frecuente también resulta en muchos terapéuticos peptídicos potenciales con un costo previsto de tratamiento inaceptablemente elevado. La presencia de

grandes cantidades de péptido degradado también puede generar efectos secundarios no deseados.

Malestar en la administración y los altos costos son dos razones por las cuales la mayoría de los péptidos terapéuticos con perfiles de bioactividad atractivos no pueden ser desarrollados como fármacos candidatos.

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

Por tanto, es deseable identificar péptidos y polipéptidos que imiten la función de apelina, pero han aumentado la vida media y demuestren bioactividad equivalente o mayor que la apelina de origen natural. Además, es deseable identificar péptidos y polipéptidos análogos de apelina que presenten aumento de restricciones conformacionales, es decir, la capacidad de alcanzar y mantener un estado conformacional activo de tal manera que los péptidos y polipéptidos puedan interactuar con sus receptores y/o otros objetivos de la vía sin necesidad de plegado o reposicionamiento adicional. Otros enfoques incluyen la reducción de la tasa de eliminación mediante la conjugación de los péptidos con moléculas que impiden su eliminación a través del riñón.

Hay así una necesidad de péptidos terapéuticos modificados con una mayor vida media con el fin de proporcionar una mayor duración de acción in vivo, manteniendo al mismo tiempo una baja toxicidad pero conservando las ventajas terapéuticas de los péptidos modificados.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN:

Esta invención está dirigida a superar el problema de la degradación del péptido en el cuerpo mediante la modificación del péptido terapéutico o polipéptido de interés, es decir, agonistas de APJ.

El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos péptidos y polipéptidos o bioconjugados de los mismos, que son útiles como agonistas de APJ, y que también poseen al menos una de las siguientes mejoras sobre la apelina tipo silvestre y otros análogos de apelina conocidos: vida media aumentada; mayor inmunidad a la degradación después de la administración y/o ante una solubilización; y aumento de restricciones conformacionales, todo mientras se exhibe la misma o mayor actividad biológica que la de apelina tipo silvestre. Los

péptidos y polipéptidos de esta invención, o bioconjugados de los mismos, son por lo tanto particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca, trastornos y afecciones asociadas con insuficiencia cardíaca, y trastornos y afecciones que responden a la activación de la actividad del receptor APJ.

En una realización, los péptidos y polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de un trastorno o afección asociada con la insuficiencia cardíaca, o un trastorno sensible a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor APJ . En otra realización, los peptidos y polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

La invención se refiere a los péptidos y polipéptidos, o bioconjugados de los mismos, composiciones farmacéuticas, y métodos de fabricación y uso de los mismos, como se describe en el presente documento. Ejemplos de péptidos y polipéptidos de la invención incluyen los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, así como cualquiera de los péptidos o polipéptidos enumerados específicamente en este documento, y bioconjugados de los mismos, incluyendo pero no limitado a los ejemplos experimentales.

Por consiguiente, la invención proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I), (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea, ausente o es Q, A o PE, o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es aminoácido que contiene azufre seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, HhC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

Como se explicó adicionalmente en la presente, las abreviaturas de tres letras o una letra reconocidas en la técnica se utilizan para representar residuos aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. ~~A menos que esté precedido por una "D", el aminoácido es un L aminoácido~~. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, ésta se refiere al aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, ésta se refiere al aminoácido D Alternavamente, un aminoácido D se puede representar con una letra D al comienzo de la abreviación, por ejemplo, cuando esta preceiddo por una "D", el aminoácido esn un aminoácido D.

Cualquiera de los residuos aminoácidos listados anteriormente de la Fórmula I, o sus fórmulas relacionadas descritas en la presente, ej., Fórmulas I a IV, pueden sustituirse de manera conservadora, siempre que el péptido o polipéptido de la invención retenga la actividad funcional y propiedades estructurales (ej., extensión de vida media, protección contra degradación, restricción conformacional). Principios y ejemplos de sustituciones conservadoras y permisibles de aminoácidos se explican adicionalmente en la presente.

La invención proporciona además un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende:

a. un péptido o un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV,
b. Una fracción de extensión de vida media;

en el que dicho péptido o polipéptido y dicha vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

"Opcionalmente a través de un enlazador" significa que el péptido del polpéptido de acuerdo con las fórmulas I-IV esta covalentemente unido o fusionado directamente al grupo que extiende la vida media (por ejemplo, sin un enlazador) o está covalentemente unido o fusionado directamente al grupo que extiende la vida media a través de un enlazador.

La fracción de extensión de vida media de la invención puede ser covalentemente fusionado, unido, ligado o conjugado con un péptido o análogo de polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; un ácido graso o cualquier

proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un residuo de unión a albúmina. Un "residuo de unión a albúmina" como se usa aquí significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina de suero humano. En una realización, el residuo de unión a albúmina es un residuo lipofílico. En otra realización, el residuo de unión a albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico. Un residuo de unión a albúmina comprende típicamente un ácido carboxílico que puede ser cargado negativamente. Ejemplos de residuos de unión a albúmina incluyen ácidos grasos. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptidos de unión a albúmina o residuos tales como por ejemplo un ácido graso. Preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una albúmina de suero humano o una región Fc. Lo más preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una región Fc.

La fracción de extensión de vida media está unido de tal manera con el fin de mejorar, y/o no interferir con, la función biológica de las partes constituyentes de los bio-conjugados de la invención, por ejemplo, el péptido o polipéptido de la invención (Fórmulas I-IV). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención puede fusionarse a una fracción de extensión de vida media, opcionalmente a través de un enlazador. La fracción de extensión de vida media puede ser una proteína tal como un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o polipéptidos o residuo (por ejemplo, un ácido graso) de unión a albúmina. Tales proteínas descritas en este documento también pueden formar multímeros.

En algunas realizaciones, la fracción de extensión de vida media (por ejemplo, HSA, Fc, ácidos grasos, etc) se une covalentemente o fusiona con el extremo N del péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I-IV. En otras realizaciones, la fracción de extensión de vida media (por ejemplo, HSA, Fc, ácidos grasos, etc) está covalentemente unida

o fusionada al extremo C del péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV de la invención.

Los polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

En una forma de realización preferida, los polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD).

En otra realización, la invención se refiere a un método de tratar un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de tal manera que se trate el trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ en el sujeto.

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

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

En otra realización, la invención se refiere a un método para la activación del receptor APJ en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende: administrar al sujeto una cantidad

terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para propósitos de interpretar esta especificación, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se especifique lo contrario y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural y viceversa.

Como se usa aquí, "trastornos o enfermedades que responden a la modulación del receptor APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de la actividad del receptor APJ", "trastornos sensibles a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor APJ, "y términos similares incluyen la insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

Como se usa aquí, "Activación de la actividad del receptor APJ," o "activación del receptor APJ," se refiere a un aumento en la actividad del receptor APJ. La activación de la actividad del receptor APJ también es referido como "agonismo" del receptor APJ, por ejemplo, mediante la administración de los péptidos y polipéptidos de la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Excepto para las abreviaturas para los aminoácidos poco comunes o no naturales expuestos en la Tabla 1 a continuación, las abreviaturas de tres letras o una letra reconocidas en la técnica se utilizan para representar los residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por “D,” el aminoácido es un aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayuscula, ésta se refiere al aminoácido D. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minuscula, ésta se refiere al aminoácido L. Los grupos o cadenas o abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar los péptidos. Los

péptidos se indican con el extremo N en la izquierda y la secuencia se escriben desde el extremo N al extremo C.

Los péptidos de la invención contienen aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza) y otros análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica puede emplearse alternativamente.

Ciertos aminoácidos no naturales pueden introducirse por la tecnología descrita en Deiters, J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang , Science 292: 498-500, 2001; Zhang, Science 303:371-373, 2004 o en la Patente EE.UU. No. En pocas palabras, algunos de estos sistemas de expresión implican la mutagénesis dirigida a sitio para introducir un codón sin sentido, como lo es codón TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Dichos vectores de expresión luego se introducen en un huésped que puede utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y cargado con el aminoácido no natural de elección. Aminoácidos no naturales particulares que son beneficiosos para el propósito de conjugar fracciones con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con acetileno y cadenas laterales de azido.

Uno o más de los aminoácidos naturales o no naturales en un péptido de la invención se pueden modificar, por ejemplo, por 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, un enlazador para la conjugación, funcionalización, u otra modificación, etc. Dichas modificaciones se pueden hacer de una manera específica a sitio o no específica a sitio. En una realización preferida, las modificaciones del péptido llevan a un péptido más estable (por ejemplo, uno que presenta una mayor vida media in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la incorporación de aminoácidos D adicionales, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido, pero tales modificaciones pueden conferir propiedades deseables, por ejemplo, actividad biológica mejorada, en el péptido.

Dichas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de la invención en relación con las proteínas tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de fijación para, por ejemplo, las etiquetas y los agentes de extensión de vida media proteica, y para fines de fijar dichos variantes a la superficie de un soporte sólido.

En ciertas realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo modificaciones específicas a sitio, se utilizan para fijar conjugados, ej., grupos PEG a polipéptidos, y/o péptidos de la invención, para fines de por ejemplo, extender la vida media o de otra manera mejorar las propiedades biológicas de dichos polipéptidos, y/o péptidos. Dichas técnicas se describen adicionalmente en la presente.

En otras realizaciones, tales modificaciones, ej., las modificaciones específicas a sitio, se utilizan para fijar otros polímeros y moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que extienden la vida media del polipéptido de la invención. Tal realización incluye la fijación de ácidos grasos o compuestos específicos de fijación de albúmina a polipéptidos, y/o péptidos. En otras realizaciones, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular y pueden fijarse en uno o más sitios sobre los polipéptidos.

En otras realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas a sitio se utilizan como elementos de fijación para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetradímeros.. Estas moléculas de proteínas multiméricas, pueden además tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colésterol fijados o a ser fusionados ya sea de manera amino-terminal o carboxi-terminal con otras proteínas, tales como Fc, Albúmina de Suero Humano (HSA), etc.

En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos en donde la posición de la pirrolisina o análogo de pirrolisina específicamente incorporada a sitio o aminoácidos de origen no natural (para-acetil-Phe, para-azido-Phe) permite la orientación controlada y fijación de tales proteínas, polipéptidos y/o péptidos sobre una superficie de un soporte sólido o tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colésterol fijados.

En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando así hetero-oligómeros incluyendo pero sin limitar a heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido, conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido. En otras realizaciones, una modificación específica a sitio puede incluir una punto de

ramificación para permitir que más de un tipo de molécula sea fijada en un único sitio de una proteína, polipéptido o péptido.

En otras realizaciones, las modificaciones listadas en la presente pueden realizarse en una forma no específica a sitio y resultar en conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido, conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido de la invención.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona complejos que comprenden al menos un péptido o polipéptido de una cualquiera de las Fórmulas I-IV unido a un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une específicamente a un péptido o polipéptido como se describe aquí.

Un experto normal en la técnica apreciará que varias sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras, pueden hacerse en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento, sin necesariamente disminuir su actividad. Como se usa en este documento, "aminoácido comúnmente usado como un sustituto del mismo" incluye sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). A efectos de sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrófobos) 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 cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (acídicos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido L por su aminoácido D correspondiente, la sustitución de cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene tiol, la sustitución de una lisina por homolisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene amino, o la sustitución de una alanina por norvalina o similares.

El término "aminoácido", como se utiliza en la presente, se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales, todos en sus éstereoisómeros D y L, si su estructura permite tales formas éstereoisoméricas. Los aminoácidos se denominan en adelante ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras

comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímicos IUPAC-IUB.

El término “de origen natural” se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. Del mismo modo, "no natural" como se utiliza en la presente se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o ha sido sintetizado por el hombre. Cuando se utiliza en conexión con aminoácidos, el término “de origen natural” se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A o Ala), cisteina (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), triptofano (W o Trp), y tirosina (Y o Tyr)).

Los términos "aminoácido no natural" y “aminoácido innatural” como se utilizan en la presente para representar las estructuras de aminoácidos que no se pueden generar biosintéticamente en cualquier organismo usando genes sin modificar o modificados a partir de cualquier organismo, ya sea el mismo o diferente. Los términos se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia proteica de Adelina de origen natural (tipo silvestre) o las secuencias de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos naturales, selenocisteína, pirrolisina (PYL), o pirrolina-carboxi-lisina (PCL, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente PCT WO2010/48582). Tales residuos aminoácidos no naturales pueden introducirse por la sustitución de aminoácidos de origen natural y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia proteica Apelina natural (tipo silvestre) o las secuencias de la invención. El residuo aminoácido no natural también puede incorporarse de tal manera que una funcionalidad deseada se imparte a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad para enlazar una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utiliza en conexión con aminoácidos, el símbolo “U” significa “aminoácido no natural” y aminoácido innatural,” como se utiliza en la presente.

Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt modificada (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" pares son generados por un proceso de selección desarrollado por Schultz o por mutación aleatoria o específica. A manera de

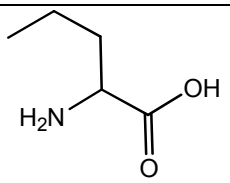
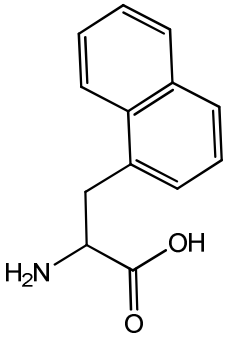
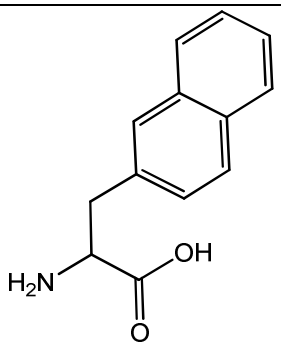
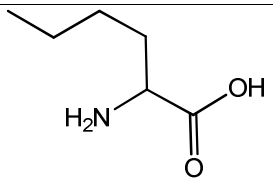
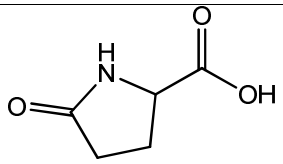
ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un “aminoácido natural” generado biosintéticamente por genes transferidos desde un organismo en las células huésped e incorporado en proteínas utilizando genes de sintetasa de ARNt natural y ARNt, mientras *p*-aminofenillalanina (Ver, Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) es un “aminoácido no natural” puesto que, aaunque se genera biosintéticamente, se incorpora en las proteínas por un par tRNA/tRNA sintetasa ortogonal “seleccionado”.

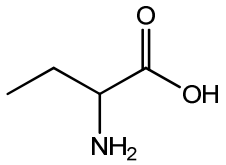
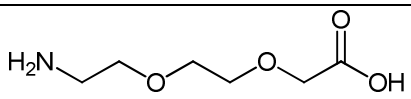
Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidinacarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-amino-butírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butil*g*licina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, 2,2 '-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropriónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipecólico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye aminoácidos naturales que son metabolitos de ciertos organismos, pero no están codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

El término “análogo aminoácido,” como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a manera de ejemplo solamente, un carbono-α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R Análogos aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que son químicamente bloqueados, de manera reversible o irreversible, o su grupo carboxi C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral son químicamente modificados. Tales análogos incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, S-(carboximetil)-cisteína, S-(carboximetil)-cisteína sulfóxido, S-(carboximetil)-cisteína sulfona, ácido aspártico-(beta-

éster metílico), N-etilglicina, carboxamida de alanina, homoserina, norleucina, y metionina metil-sulfonio.

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

Símbolo	Nombre	Estructura
Nva o nva (D-Nva)	L-Norvalina o D-Norvalina	
1-Nal	1-Naftilalanina	
2-Nal	2-Naftilalanina	
Nle o nle (D-Nle)	L-Norleucina o D-Norleucina	
pE	Ácido piroglutámico	

Abu o abu (D-Abu)	Ácido 2-amino-butírico	
O2Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico	

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

Como se utiliza en la presente, el término “amida” se refiere a un derivado de amida del grupo de ácido carboxílico en el extremo C (ej.-$C(O)NH_2$,-$C(O)NH$-C_{1-6} alquilo,-$C(O)NH$-C_{1-2}alquilfenilo,-C(O)NH-NHBn o-C(O)-4 fenoxipiperidina o –$C(O)N(C_{1-6}$ alquilo$)_2$).

El término “amida” también se refiere a derivados del grupo amino en el extremo N (ej.,-$NHC(O)C_{1-16}$alquilo,-$NHC(O)(CH_2)_n$Ph (n es un entero de 1 a 6),-$NHC(O)(CH_2)_2CO_2H$, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)NH$-, $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-, $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-; $C_{15}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)NH-, Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-NH- o $CH_3(OCH_2CH_2)_mC(O)NH$- (m es un entero de 1 a 12).

Como se utiliza en la presente, el término “éster” se refiere a un derivado éster del grupo de ácido carboxílico en la forma del extremo C (ej.,-COOR) en donde R del éster se refiere a grupos C_{1-6} alquilo tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc., grupos C_{3-8} cicloalquilo tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos C_{6-10} arilo tales como fenilo, α-naftilo, etc., grupos C_{6-10} aril-C_{1-6} alquilo, por ejemplo grupos fenil-C_{1-2} alquilo tales como bencilo, fenetilo, benzhidrilo, etc., y grupos α-naftil-C_{1-2} alquilo tales como α-naftilmetilo y similares. Se puede hacer mención de éster de pivaloiloximetilo y similares, los cuales comúnmente se utilizan como ésteres para administración oral. Cuando los polipéptidos de la invención poseen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en posiciones diferentes del extremo C, estos polipéptidos en los cuales tales grupos son amidados o ésterificados también están en la categoría del polipéptido de la invención. En tales casos, los

ésteres pueden por ejemplo ser las mismas clases de ésteres que los ésteres C-terminales mencionados anteriormente.

El término alquilo se refiere a una fracción de hidrocarburo ramificada o no ramificada completamente saturada (o cadena lineal), que comprende 1 a 20 átomos de carbono. Preferiblemente, el alquilo comprende 1 a 7 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

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

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

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

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

El término "APJ" (también conocido como "receptor de apelina", "receptor de angiotensina-tipo-1", "receptor de angiotensina II-tipo-1", y similares) indica un dominio 7

transmembrana de 380 residuos, receptor acoplado a *Gi* cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en humanos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_005152.1, y codificado por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_005161). APJ primero se clonó en 1993 a partir de ADN humano genómico utilizando cebadores de oligonucleotidos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor de angiotensina II tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina II no se une a APJ. Aunque huérfano desde hace muchos años, el ligando endógeno ha sido aislado y nombrado apelina (Tatemoto et aI., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

El término "apelina", indica una preproteına de 77 residuos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_0059109.3, y codificado por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_017413.3), la cual se transforma en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, denominado "apelina-36," comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13mer de apelina (apelina-13), conocido como "Pyr-1-apelina-13 o Pyr^{1}-apelina-13. Diferentes formas de apelina "se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.492.324 B1.

El término "conjugado" y "bioconjugado" se utiliza indistintamente y pretende referirse a la entidad formada como resultado de una unión covalente entre un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV, y una fracción de extensión de vida media, opcionalmente a través de un enlazador . El término "conjugado" o "bioconjugado" también pretende incluir una entidad formada como resultado de una fusión entre un polipéptido agonista de APJ o un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV, y una fracción de extensión de vida media.

La fracción de extensión de vida media puede ser covalentemente unido/ligado o fusionado con un análogo de péptido o polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), ácido graso, un grupo de colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un residuo de unión a albúmina. Un "residuo de unión a albúmina" como se usa aquí significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina de suero humano. En una realización, el residuo de unión a albúmina es un residuo lipofílico. En otra

realización, el residuo de unión a albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico. Un residuo de unión a albúmina comprende típicamente un ácido carboxílico que puede ser cargado negativamente. Ejemplos de residuos de unión a albúmina incluyen ácidos grasos. En otra realización, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. Por ejemplo, la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptido de unión a albúmina o residuos tales como por ejemplo un ácido graso. Lo más preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una región Fc.

El término "vida media aumentada" o "vida media sérica aumentada" o "extender lvida media" se entiende el cambio positivo en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada (por ejemplo apelina 13) en relación con su forma no-modificada (o forma desnuda del péptido). La vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa, y la determinación de la concentración esa molécula en cada muestra. Medir el cambio en la concentración en suero con el tiempo permite el cálculo de la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo, molécula conjugada). Mediante comparación, la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo molécula conjugada), con una molécula no modificada (por ejemplo, apelina 13), el aumento relativo de la vida media en suero o T1/2 se puede determinar. El aumento es deseablemente al menos aproximadamente de dos veces, pero un aumento más pequeño puede ser útil.

Polipéptidos de la invención:

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

En la realización 1, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente, Q, A o PE o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, Hc o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es un azufre y contiene amino-ácido seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, HhC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, o a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

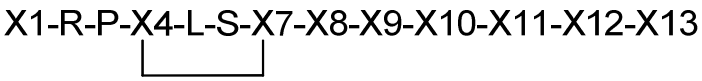
D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

En la realización 2, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 2):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y es bien sea ausente, Q, A o pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

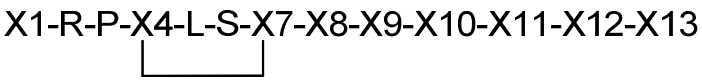
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , M, Nle o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido, o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

En la realización 2A, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 3):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente o pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

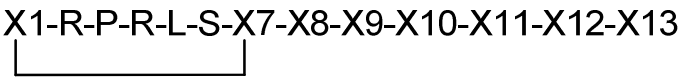
X10 es P o ausente;

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

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido, o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

En la realización 3, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



III

en donde

X1 es el extremo N del polipéptido y se selecciona a partir de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X1;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

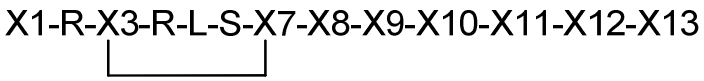
X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me)F, F, f, a, y y Nal;

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

En la realización 3A, la invención se refiere a polipéptidos de la Fórmula III en la que X11 es D-Nle, Nle o f, o una amida, un éster o una sal del mismo.

En la realización 4, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula IV (SEQ ID NO: 5):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y es bien sea ausente, Q, A o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

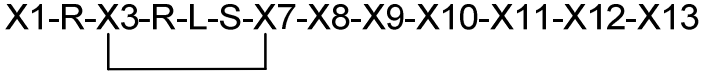
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 4A, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula IV (SEQ ID NO: 6):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

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

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 5, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4 en la que X1 es PE; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 5A, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4 en la que X1 es A o Q; o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En un aspecto particular de esta forma de realización, el péptido está unido químicamente o fusionado a una fracción de extensión de vida media a través de su extremo A o Q N.

En la realización 6, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1, 2, 4 y 4A en la que X1 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 7, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 4 y 6 en donde el extremo N es una amida; o una sal del polipéptido.

En la realización 8, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 7 en donde el extremo N es una amida de la fórmula-NHR y R es acetilo, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; o una sal del polipéptido.

En la realización 8A, la invención se refiere a un polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 y 7 en donde el extremo N es una amida de la Fórmula NHR1 en el que R1 es $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-C(O)-, palmitoil$(O2Oc)_p$, miristoílo$(O2Oc)_p$, lauroilo $(O2Oc)_p$ 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;

Lauroilo(O2Oc) es $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Miristoilo(O2Oc) es $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Palmitoilo(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. Ejemplos de amidas del extremo N se han descrito en la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/591.557 (Expediente de Agente Número PAT054961-US-PSP) presentado el 27 de enero de 2012, que se incorpora como referencia.

En la realización 9, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8A en donde X13 es F o f; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 10, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8A en donde X13 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 11, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-10 en donde X12 está ausente; o una amida, y éster o una sal del polipéptido.

En la realización 12, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 11 en donde el extremo C es una amida; o una sal del polipéptido.

En la realización 13, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 12 en donde el extremo C es una amida de la Fórmula –C(O)-R2 y R2 es-NH_2,-NH-Me,-NH-NHBn,-$N(CH_3)$-$(CH_2)_2$-Ph o-NH-$(CH_2)_2$-Ph; o una sal del polipéptido.

En la realización 14, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-13 en donde X8 es K; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 15, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 14 en donde X9 es G; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 16, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 15 en donde X10 es P; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

19.

En la realización 17, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 16 en donde X11 es Nle o D-Nle; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 17A, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en donde el extremo C que consta de la fracción de X11-X12-X13 se selecciona de Nle-P-fenetilamina, Nle-P-(N-Me)F, Nle-P-NH2, Nle-Phenetilamina, (D-Nle)-fenetilamina, Nle-P-f, D-Nle-a-f, (D-Nle)-NH2, (D-Nle)-f, (D-Nle)-a-d, (D-Nle)-a-y, (D-Nle)-(D-Nva)-f, Nle-P-F, Nle-P-a, Nle-P-NaI y (D-Nle)-(D-Abu)-f, o una sal del polipéptido. En un aspecto particular de esta realización, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 17A en la que el extremo C que consiste de la fracción de X11-X12-X13 se selecciona a partir de (D-Nle)-fenetilamina, (D-Nle)-a-f y f-a-f, o una sal del polipéptido.

En una realización 17B, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en donde al final dos de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En otra realización, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en donde al menos tres de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En aún otra realización, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en el que al menos cuatro de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13.

En otra realización, los aminoácidos X1, X3, X4 y X7-X13 son los definidos por los aminoácidos X1, X3, X4, y X7-X13 en la sección de Ejemplos a continuación.

En otra realización, los péptidos individuales según la invención son aquellos listados en la sección de Ejemplos a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

A menos que se especifique lo contrario, el término “polipéptido de la presente invención” se refiere a un polipéptido de la Fórmula (I) y subfórmulas de la misma (Fórmulas II, III a IV); o una amida, un éster o una sal del mismo.

A menos que se especifique lo contrario, los términos “polipéptidos de la presente invención,” “péptidos de la presente invención,” “agonistas peptídicos de apelina,” y similares se refieren a péptidos y polipéptidos de la Fórmula I y subfórmuilas de los mismos (Fórmulas II, III, o IV); o una amida, un éster o una sal de los mismos. Los péptidos y polipéptidos de la invención demuestran actividad equivalente o mejorada y/o estabilidad plasmática sobre péptidos de apelina conocidos y polipéptidos descritos en la presente, incluyendo pero sin limitar a apelina tipo silvestre, apelina-13 y pyr-1-apelina-13.

Los péptidos y polipéptidos de la invención también incluyen péptidos y polipéptidos que son al menos 95% idénticos a los péptidos y polipéptidos según cualquiera de las Fórmulas I, II, III o IV, o una amida, un éster o una sal de los mismos, así como también a cualquiera de los péptidos o polipéptidos específicamente listados en la presente, incluyendo pero sin limitar a los ejemplos experimentales.

Como se utiliza en la presente, la frase "secuencia aminoácida homóloga," o variaciones de la misma, se refiere a las secuencias caracterizadas por una homología, a nivel aminoácido, de por lo menos un porcentaje determinado y se utiliza de manera intercambiable con "identidad de secuencia". Secuencias aminoácidas homólogas incluyen las secuencias aminoácidas que contienen sustituciones aminoácidas conservativas y cuyos polipéptidos tengan la misma unión y/o actividad. En algunas realizaciones, una secuencia aminoácida es homóloga si tiene al menos 60% o más, hasta 99%, de identidad con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, una secuencia aminoácida es homóloga si comparte uno o más, hasta 60 sustituciones, adiciones, o supresiones aminoácidas con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, las secuencias aminoácidas homólogas no tienen más de cinco o no más de tres sustituciones aminoácidas conservadoras.

La homología también puede ser a nivel de polipeptídico. El grado o porcentaje de identidad de péptidos o polipéptidos de la invención, o porciones de los mismos, y secuencias aminoácidas diferentes se calcula como el número de equivalencias exactas en una alineación de dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o la "secuencia extraña", la que sea más corta. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

Un polipéptido que comprende una secuencia aminoácida que tiene una homología de 80-99.9% aproximadamente, preferiblemente 90-99.9% con la secuencia aminoácida descrita en los ejemplos específicos, y que posee una estabilidad plasmática superior a apelin-13 orpyr-1-apelin-13, están bajo la categoría del polipéptido de la invención. En una realización, la mejora de estabilidad plasmática es al menos de dos veces. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 60 minutos, o al menos 80 min, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

El término "sustancialmente equivalente" significa la naturaleza de la actividad de unión al receptor, actividad de transducción de la señal y similares es equivalente. Por lo tanto, es permisible que incluso diferencias entre las calidades tales como la fuerza de la actividad de unión al receptor y el peso molecular del polipéptido estén presentes.

Un polipéptido como se describe aquí, o un equivalente sustancial al mismo, por sustitución, deleción, adición o inserción de uno o más de los aminoácidos se pueden mencionar como polipéptidos que contienen equivalentes sustanciales de secuencias de aminoácidos en el sentido anterior. Un polipéptido como se describe en la presente, o un equivalente sustancial del mismo, por la sustitución de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3 y más preferiblemente 1 o 2 aminoácidos por aminoácidos naturales o no naturales se pueden mencionar como polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de secuencias de aminoácidos en el sentido anterior. Otras modificaciones y alteraciones pueden incluir la sustitución de un aminoácido L por un aminoácido D, u otra variación incluyendo, pero no limitado a, fosforilación, carboxilación, alquilación y similares, siempre y cuando la actividad agonista de apelina del péptido o polipéptido de las fórmulas I, II, III o IV se mantiene y la estabilidad del plasma se mejora sobre la forma piroglutamada de apelina-13.

En la realización 19, la invención además se refiere a un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende:

a. un péptido o polipéptido de las Fórmulas I, II, III o IV, una amida, sal o éster del mismo, según cualquiera de las realizaciones anteriores;
b. Una fracción de extensión de vida media;

en donde dicho péptido o polipéptido y dicha fracción de extensión de vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 19A, la fracción de extensión de vida media está unida al extremo N del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 19B, la fracción de extensión de vida media está unida covalentemente o fusionada al extremo C del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 19C, la fracción de exrensión de vida media está covalentemente unida o fusionada a una cadena lateral del péptido de la Fórmula I, II, III o IV, por ejemplo, la vida media está covalentemente unida o fusionada a un grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn, opcionalmente a través de una fracción enlazadora. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está unida al extremo N del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 20, la invención se refere a el bioconjugado o un mutimero del mismo, de acuerdo con la realización 19, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo, un ácido graso o una albúmina de suero humano.

En la realización 21, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con las realizaciones 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es un fragmento Fc modificado de FcLALA con una mutación LALA (L234A, L235A).

En la realización 22, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 21 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que se fusiona o se une covalentemente a un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV a través de un enlazador y en donde el enlazador tiene la siguiente fórmula:-[GGGGS] n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ

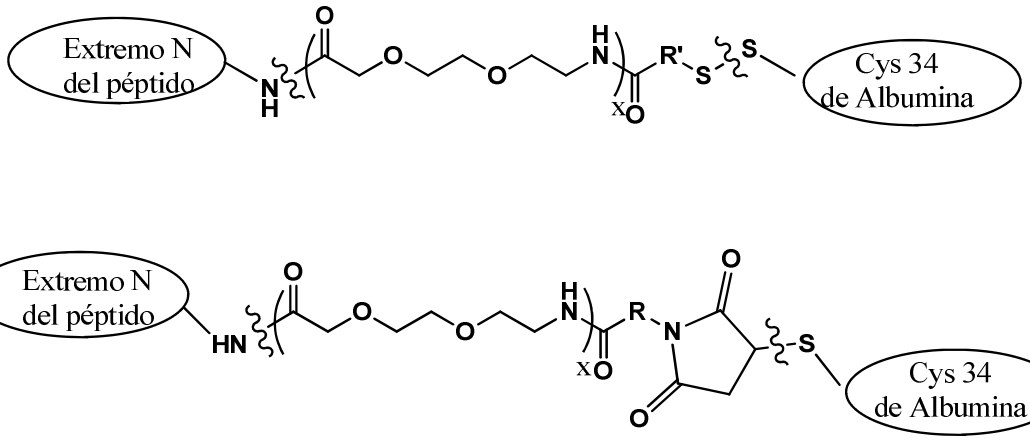
ID NO: 7) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural.

En la realización 23, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 22 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I se selecciona del QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 10), en donde los dos aminoácidos marcados con "*" representar los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o de amida a través de su cadena lateral.

En la realización 23A, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con la realización 22 o 23 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisana del extremo C ha sido eliminada o sustituida por alanina. Tales variantes Fc se han descrito en la solicitud co-presentada (Solicitud provisional EE.UU. No 62/015848:número de expediente PAT055781-US-PSP02) y han generado proteínas de fusión más estables con péptidos/polipéptidos de apelina.

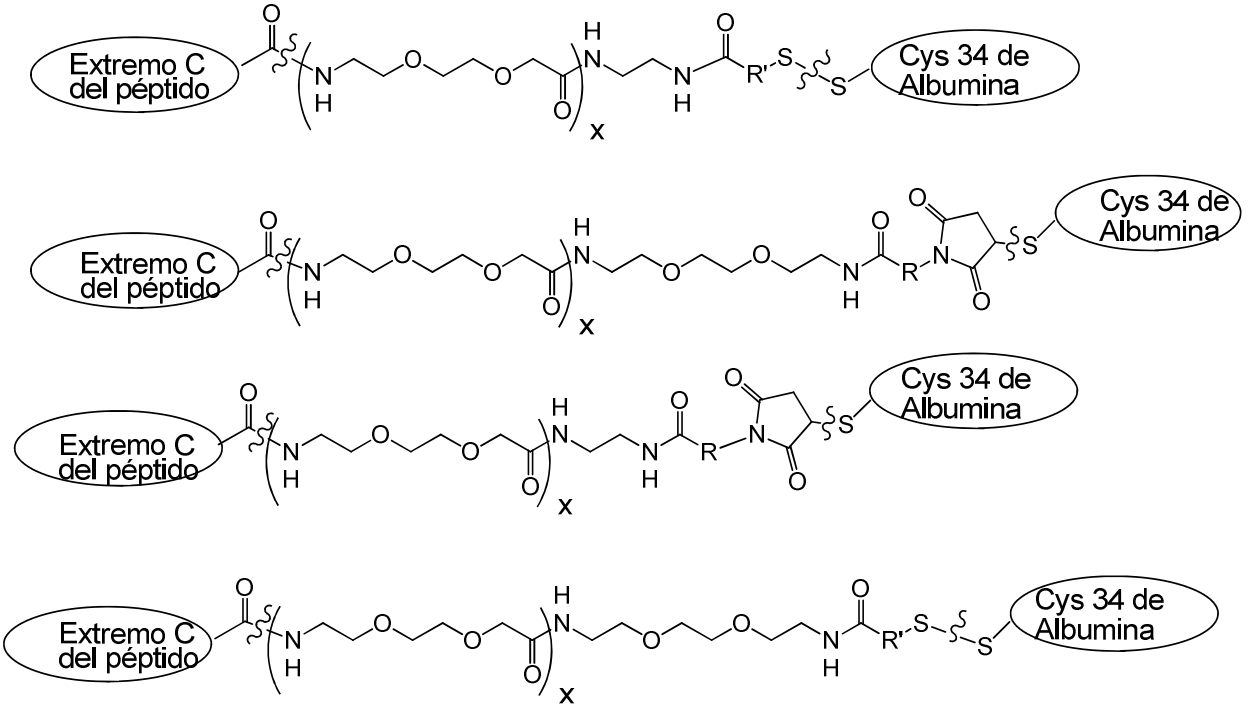
En la realización 24, la invención se refiere al bioconjugado o multímero del mismo de acuerdo con la realización 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es albúmina de suero humano.

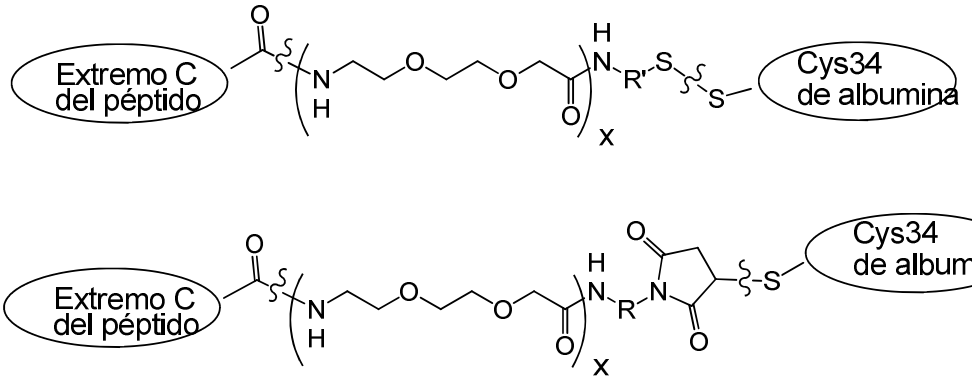
En la realización 25, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 24, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo N de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:



en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

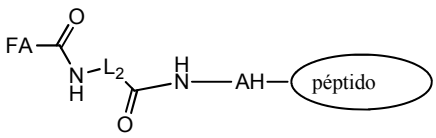
En la realización 26, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 19 o 20, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo C de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:



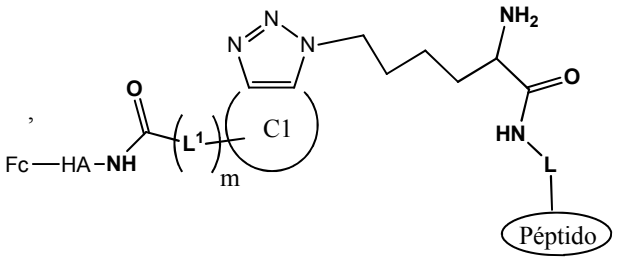


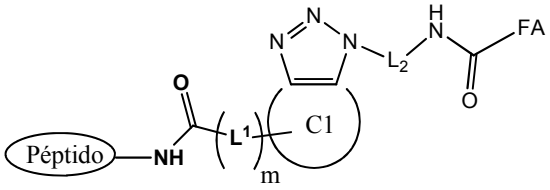
en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

En otra realización, el bioconjugado de la invención tiene las siguientes fórmulas:



,





o

Fc-[GGGG]n-LPETL-Péptido Extremo N (SEQ ID NO: 11)

en donde el péptido es el extremo N del péptido, A es alanina, H es histidina, n es 1, 2 o 3, m es 0 o 1, L y L2 son enlazadores, C1 es un sistema de anillo mono, di o tricíclico carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido por flúor y L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en donde la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= o), y en donde uno o más de carbono se sustituye por O o NH. En un aspecto particular de esta realización, L y L2 son enlazadores PEG.

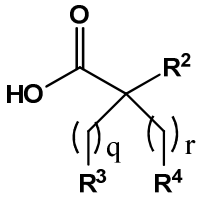
Fracción de Extensión de Vida Media

La fracción de extensión de vida media de la invención puede ser covalentemente unida, ligada, conjugada o fusionada con un análogo de péptido o polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un ácido graso, un grupo de colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. Por ejemplo, la fracción de extensión de vida media es un

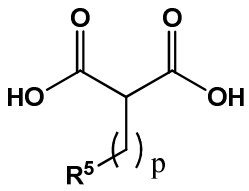
dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptido de unión a albúmina o residuos (por ejemplo un ácido graso). Preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una albúmina de suero humano, un ácido graso o una región Fc.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen albúmina, que se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodaltons en su forma monomérica, dependiendo de la especie de origen. El término "albúmina" se usa indistintamente con "albúmina de suero" y no está destinada a definir la fuente de la albúmina que forma un conjugado con los péptidos modificados de la invención. Por lo tanto, el término "albúmina", como se usa en el presente documento puede referirse bien sea a la albúmina purificada a partir de una fuente natural tal como sangre o fluidos sericos, o puede referirse a albúmina quimicamente sintetizada o recombinantemente producida. Péptidos o polipéptidos de la invención modificados son preferentemente atados al grupo tiol libre de la cisteína-34 en la superficie de la albúmina, opcionalmente a través de un enlazador.

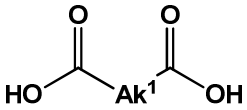
Las fracciones de extensión de vida media incluyen ácidos grasos, que pueden ser definidos como un alquilo C6-70, un alquenilo C6-70 o una cadena de alquinilo C6-70, cada uno de los cuales es sustituido con al menos un ácido carboxílico (por ejemplo 1, 2, 3 o 4 CO2H) y además opcionalmente sustituido por el grupo hidroxilo. Ejemplos de ácidos grasos se definen por las Fórmulas A1, A2 y A3:



A1



A2



O A3

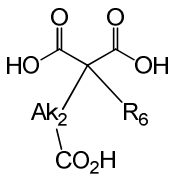
R^2 es CO_2H, H;

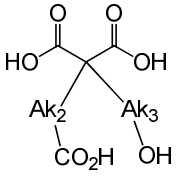
R^3, R^4 y R^5 son independientemente de cada uno de los demás H, OH, CO_2H,-$CH=CH_2$ o –C≡CH;

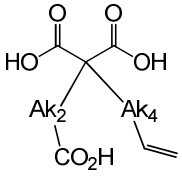
Ak1 es un alquileno C6-C30 ramificado;

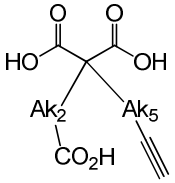
q, r y p son independientemente uno de otro un número entero entre 6 y 30; o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Ejemplos de ácidos grasos se seleccionan a partir de:

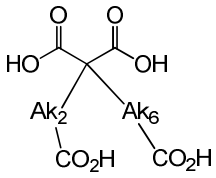


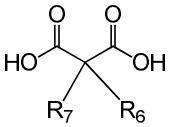
,


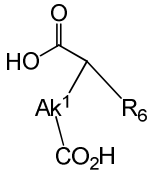
,


,


,

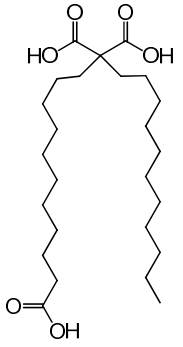


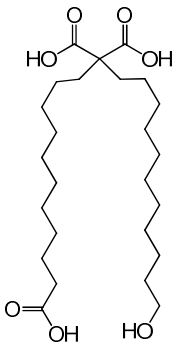
,


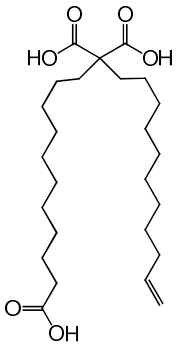
y


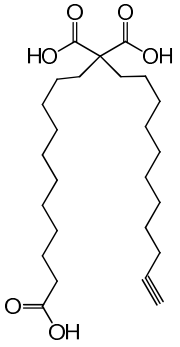
en donde Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 y Ak^6 son independientemente un (C_{8-20})alquileno, R^6 y R^7 son independientemente alquilo(C_{8-20}).

Más específicamente, los ácidos grasos se seleccionan a partir de:

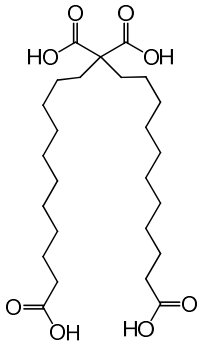


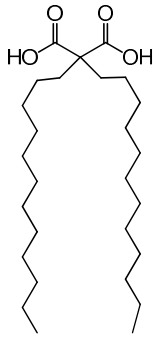
,


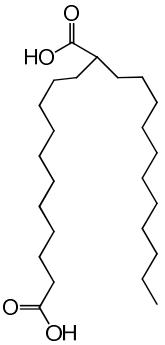
,


,


,



,


y


.

Estas fracciones de ácidos de ácidos grasos se han descrito en la solicitud co-presentada, Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015862; número de expediente PAT056274-US-PSP.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen "Fc nativo" que se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento no fijador de antígenos resultante de la digestión del anticuerpo entero o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente original de la inmunoglobulina del Fc nativo es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque IgG1 e IgG2 son las preferidas. Las moléculas Fc nativas están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden conectarse a formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces de disulfuro) y asociación no covalente. El número de enlaces de disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas oscila de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 y IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por puentes de disulfuro resultante de la digestión de papaína de una IgG (véase Ellison, 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). El término "Fc nativo" como se utiliza en la presente es genérico a las formas monomérica, dimérica y multimérica.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen la “variante Fc” que se refiere a una molécula o secuencia que es modificada desde un Fc nativo pero aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor Fc neonatal). Las Publicaciones Internacionales No. WO 97/34631 y WO 96/32478 describen variantes Fc de ejemplo, así como la interacción con el receptor de salvamento, y se incorporan en la presente como referencia. Por lo tanto, el término "variante Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que se pueden quitar, ya que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para el bioconjugado de la invención. Por lo tanto, el término "variante Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios Fc nativos o residuos, o en los que uno o más sitios Fc o residuos se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlaces de disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal en la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación (5), interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor

Fc diferente de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los variantes Fc se describen más adelante con más detalle.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen variantes Fc en donde la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina.

Las fracciones de extensión de vida media se refieren al "dominio Fc", que abarca variantes y secuencias nativas Fc y Fc como se definió anteriormente. Al igual que con los variantes Fc y moléculas Fc nativas, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas desde el anticuerpo completo o producidas por otros medios. En algunas realizaciones de la presente invención, un dominio Fc puede estar conjugado a un polipéptido de la fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I-IV a través de, por ejemplo, un enlace covalente entre el dominio Fc y la secuencia de péptidos. Tales proteínas Fc pueden formar multímeros a través de la asociación de los dominios Fc y estas proteínas Fc y sus multímeros son un aspecto de la presente invención.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen el "fragmento Fc modificado", que significará un fragmento Fc de un anticuerpo que comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo que comprende CH2, CH3 y parte de la región de bisagra. El fragmento Fc modificado puede derivarse a partir de, por ejemplo, IgGl, IgG2, IgG3, o IgG4. FcLALA es un fragmento Fc modificado con una mutación LALA (L234A, L235A), que dispara ADCC con eficiencia reducida, y fija y activa el complemento humano de manera debil. Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104. Modificaciones adicionales al fragmento Fc se describen en, por ejemplo, la Patente EE.UU. No. 7,217,798.

El término "multímero" tal como se aplica a dominios Fc o molécula que comprende los dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente. Por ejemplo las moléculas de IgG forman típicamente dímeros y, por tanto, un bioconjugado que comprende una molécula IgG dimérica se puede fusionar con dos cadenas de polipéptidos de la Fórmula I, IA, II, III o IV.

Enlazador

Cualquier grupo enlazador es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crítica, ya que sirve principalmente como un espaciador.

El enlazador es una fracción química que contiene dos grupos reactivos/ grupos funcionales, uno de los cuales pueden reaccionar con el polipéptido y la otra con la fracción

de extensión de vida media. Los dos grupos reactivos del enlazador están vinculados a través de un grupo de unión, la estructura del cual no es crítica, siempre y cuando no interfiera con el acoplamiento del enlazador al péptido y la fracción de extensión de vida media.

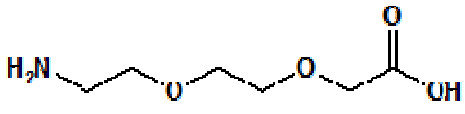
El enlazador puede estar formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la presente invención, el enlazador se compone de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos son seleccionados a partir de los 20 aminoácidos naturales. En varias realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan a partir de los aminoácidos glicina, serina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, cisteina y lisina. En algunas realizaciones, un enlazador está formado por una mayoría de aminoácidos que son estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. En algunas realizaciones, los enlazadores son poliglicinas, polyalaninas, combinaciones de glicina y alanina (tales como poli (Gly-Ala)), o una combinación de glicina y serina (como poli(Gly-Ser)). En algunas realizaciones, un enlazador comprende una mayoría de aminoácidos seleccionados de histidina, alanina, metionina, glutamina, asparagina y glicina. En algunas realizaciones, los enlazadores contienen la fracción de poli-histidina. Ejemplos de enlazadores son enlazadores que comprenden el motivo AH, MHA o AHA. Tales motivos se han descrito en las aplicaciones copendientes y aplicaciones co-presentadas, números de expediente de Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015862: PAT056274-US-PSP y expediente de Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015868: PAT056275-US-PSP, que es beneficioso para la conjugación selectiva en el extremo N de un péptido o polipéptido.

Otros ejemplos de enlazadores comprenden el motivo GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13), GGGGS (SEQ ID NO: 14), GS o GG.

En alguna otra realización, el enlazador comprende motivos de reconocimiento para la enzima. Un ejemplo es el motivo LPXTG/A que puede ser incluido en el extremo C en donde X es cualquier aminoácido, más comúnmente un E: Ácido Glutámico (L: leucina, P: prolina, T: treonina, G: Glicina, A; Alanina). (Carla P. Guimaraes: “Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions”, Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787-1799)

En otras realizaciones, el enlazador comprende de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan a partir de aminoácidos no naturales. Aunque se prefiere un enlazador de 3-15 residuos de aminoácidos para la conjugación con la fracción de extensión de vida media, la

presente invención contempla enlazadores de cualquier longitud o composición. Un enlazador de aminoácidos preferido es O2Oc de la siguiente fórmula:

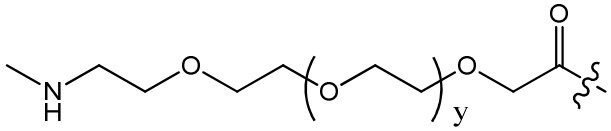


o sus unidades de repeteción.

Los enlazadores descritos en este documento son de ejemplo, y los enlazadores que son mucho más largos y que incluyen otros residuos se contemplan en la presente invención. Los enlazadores no peptídicos también se contemplan en la presente invención.

La porción enlazadora del enlazador puede comprender uno o más grupos alquilo, grupos alcoxilo, grupos alquenilo, grupos cicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo y grupos heterocíclicos o combinación de los mismos. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores alquilo tales como-NH-$(CH_2)_Z$C(O)- o-S-(CH_2)z-C(O) – o-O-(CH_2)z-C(O)-en donde z es 2-20. Estos enlazadores de alquilo pueden además sustituirse por cualquier grupo que no produzca impedimento estérico, incluyendo pero sin limitar a, un alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH2, o fenilo.

El enlazador también puede ser de naturaleza polimérica. El enlazador puede incluir cadenas poliméricas o unidades que son bioestables o biodegradables. Los polímeros con enlace de repetición pueden tener diversos grados de estabilidad en condiciones fisiológicas en función de la labilidad de enlaces. Los polímeros pueden contener enlaces tales como policarbonatos (-OC(O)-O-), poliésteres (-C(O)-O-), poliuretanos (-NH-C(O)-O-), poliamida (-C (O)-NH-). Estos enlaces se proporcionan a modo de ejemplo, y no pretenden limitar el tipo de enlaces empleables en las cadenas poliméricas o enlazadores de la invención. Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido maleico de diviniléter, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, éter poliviniletílico, y similares y mezclas de los mismos. Un enlazador polimérico es, por ejemplo PEG. Un enlazador no peptídico ilustrativo es un enlazador de glicol de polietileno:



en donde y es tal que el enlazador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kD, por ejemplo, 100 a 500 kD.

Preferiblemente, la fracción enlazadora contiene una o más fracciones de aminoácidos tales como por ejemplo unidad de (O2Oc) o glicina o serina, alquileno C1-4-C (O)-, alquileno C1-4,-NH-alquileno C2-6-NH-o unidades de NH CH_2CH_2 CH_2CH_2-NH diamino o combinación de los mismos y la fracción enlazadora enlazó 2 grupos reactivos o grupos funcionales.

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

Preparación del péptido o polipéptido y constructo de péptido-enlazador para la unión a una fracción de extensión de vida media:

Los péptidos y polipéptidos de apelina y/o constructo péptido-enlazador de la invención se pueden producir mediante cualquiera de los procesos químicos sintéticos o por métodos recombinantes o combinación de ambos métodos. Los péptidos de apelina y/o constructos péptido-enlazador se pueden preparar como de longitud completa o pueden sintetizarse como fragmentos de longitud no completa y pueden unirse. Los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos por los procedimientos conocidos per se para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de una síntesis de fase sólida y una síntesis de fase líquida. Por lo tanto, el péptido y polipéptido de interés puede ser producido por 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, el grupo protector se separa después de lo cual un péptido deseado se puede fabricar. Los métodos conocidos para la condensación y desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente bibliografía (1)-(5).

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

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

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

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

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

Después de la reacción, el péptido puede ser purificado y aislado mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos, y recristalización. Cuando el polipéptido aislado en los ejemplos anteriores es un compuesto libre, éste puede convertirse en una sal apropiada mediante el método conocido. A la inversa, donde el producto aislado es una sal, éste puede ser convertido en el péptido libre mediante el método conocido.

La amida de polipéptido se puede obtener mediante el uso de una resina para la síntesis de péptido que es adecuada para la amidación. La resina incluye resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-benciloxibencilo, resina de 4-metilbenz-hidrilamina, resina PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfeniilacetamidometilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil) fenoxilo, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil) fenoxilo, resina de cloruro de 2-clorotritilo, y así sucesivamente. El uso de tal resina, aminoácidos cuyos grupos α-amino y grupos funcionales de la cadena lateral han sido protegidos adecuadamente se condensan en la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo por diversas técnicas de condensación que son conocidos per se. Al final de la serie de reacciones, el péptido o péptido protegido se elimina desde la resina y se eliminan los grupos protectores y si es necesario, los enlaces de disulfuro se forman para obtener el polipéptido objetivo.

Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos se puede utilizar tal como

HATU, HCTU o por ejemplo, una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Para la activación con tal reactivo tal, un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, HOBt o Oxyma puro se puede utilizar. El aminoácido protegido puede ser añadido directamente a la resina junto con los reactivos de activación e inhibidor de racemización o ser pre-activado como anhídrido simétrico de ácido, éster de HOBt, o éster HOOBt después se añadió a la resina. El solvente para la activación de aminoácidos protegidos o condensación con la resina se puede seleccionar adecuadamente de entre los disolventes que se sabe son útiles para las reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar N, N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, sulfóxido de dimetilo, DMF, piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo, o mezclas adecuadas de éstos. La temperatura de reacción puede seleccionarse a partir del rango hasta ahora conocido por ser útil para la formación de enlaces de péptidos y por lo general se selecciona de entre el intervalo de-20° C-50° C aproximadamente. El derivado de aminoácido activado se usa generalmente en una proporción de 1,5-4 veces en exceso. Si se encuentra que la condensación es insuficiente por una prueba que utiliza la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin necesidad de retirar el grupo protector. Si la condensación repetida todavía no proporciona el suficiente grado de condensación, el grupo amino sin reaccionar puede ser acetilado con anhídrido acético o acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino para el aminoácido de material de partida incluye Z, Boc, terc-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, CI-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo, o Fmoc. El grupo protector carboxilo que se puede usar incluye, pero no se limita a alquilo C1-6, cicloalquilo C3-8 y arilo C6-10-alquilo C1-2 antes mencionados, así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, terc-butoxicarbonilhidrazido, y tritilhidrazido.

El grupo hidroxilo de serina y treonina puede ser protegido por ésterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha ésterificación incluye grupos derivados de carbono, tales como grupos alcanoilo inferiores, por ejemplo acetilo etc, grupos aroilo, ej., benzoilo etc, benciloxicarbonilo, y etoxicarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación

incluye bencilo, tetrahidropiranilo, y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina incluye Bzl, Cl_2-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z, y butilo terciario.

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

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

El método para la eliminación de grupos protectores incluye la reducción catalítica utilizando gas hidrógeno en presencia de un catalizador tal como negro de paladio o paladio sobre carbono, el tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, o una mezcla de tales ácidos, tratamiento base con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, reducción con sodio metálico en amoníaco líquido. La reacción de eliminación mediante el tratamiento ácido anteriormente mencionado se lleva a cabo generalmente a una temperatura de-20° a C-40° C y puede llevarse a cabo ventajosamente con la adición de un aceptor de cationes tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditiol, 1,2-etanoditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado para proteger el grupo imidazol de la histidina puede ser eliminado por tratamiento con tiofenol, mientras que el grupo formilo utilizado para proteger el grupo indol de triptófano se puede eliminar por tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido de sodio o amoníaco acuoso diluido así como el tratamiento con ácido mencionado anteriormente en la presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol.

El método para la protección de grupos funcionales que no deben tomar parte en la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden utilizar, el método de eliminación de los grupos protectores, y el método de activación de los grupos funcionales que van a tomar parte en la reacción puede seleccionarse todos judicialmente de entre los grupos y métodos conocidos.

Un otro método para la obtención de la forma de amida del polipéptido comprende la amidación del grupo α-carboxilo del aminoácido C-terminal primero, a continuación, se extiende la cadena del péptido al extremo N hasta la longitud de cadena deseada, y luego desproteger selectivamente el grupo α-amino del péptido C-terminal y el grupo α-carboxilo del aminoácido o péptido que es para formar el resto del polipéptido objetivo y la condensación de los dos fragmentos cuyo grupo α-amino y grupos funcionales de cadena lateral han sido protegidos con grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un disolvente mixto tal como el mencionado anteriormente en este documento. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser iguales a los descritos anteriormente en la presente. Desde el péptido protegido obtenido por condensación, todos los grupos protectores se eliminan mediante el método anteriormente descrito para proporcionar de ese modo el péptido crudo deseado. Este péptido crudo puede purificarse mediante procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal se liofilizó para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Para obtener un éster del polipéptido, el grupo a-carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para proporcionar un éster de aminoácido y, a continuación, se realiza el procedimiento descrito anteriormente para la producción de la amida.

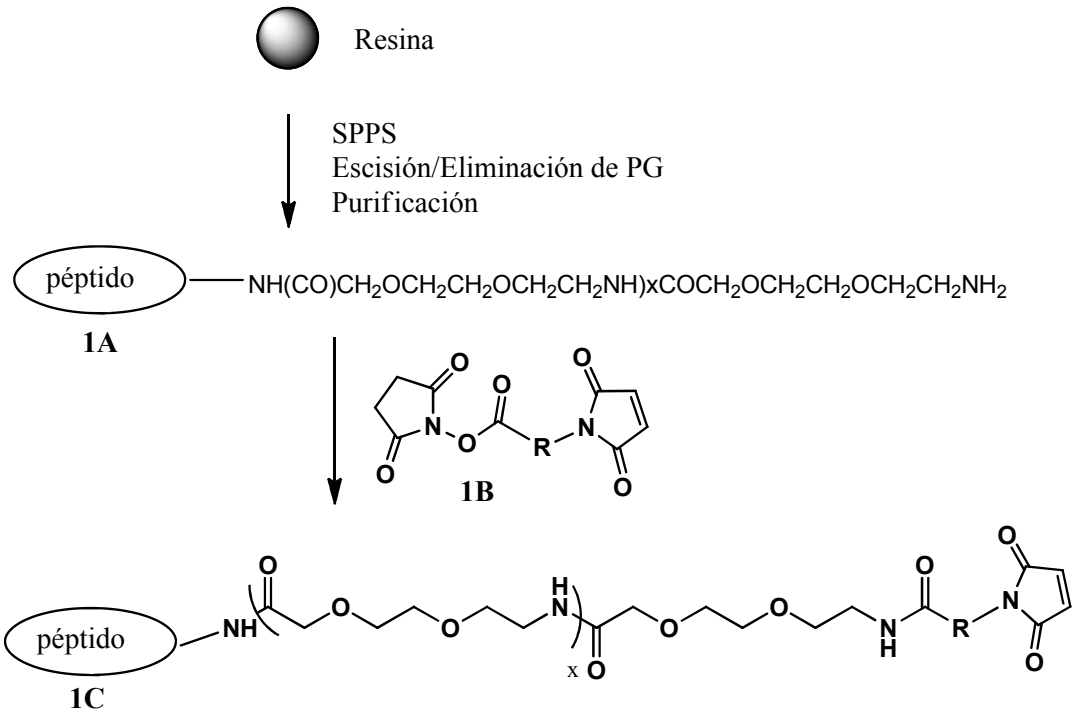
Alternativamente, los métodos de expresión recombinantes son particularmente útiles. Expresión de proteína recombinante utilizando una célula huésped (una célula diseñada artificialmente para comprender ácidos nucleicos que codifican la secuencia del péptido y que transcribirán y traducirán, y opcionalmente, secretarán el péptido en el medio de crecimiento celular) se utiliza rutinariamente en la técnica. Para el proceso de producción recombinante, un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido típicamente se sintetizará por métodos convencionales y se integrará en un vector de expresión. Tales métodos se prefieren particularmente para la fabricación de las composiciones de polipéptido que comprenden los péptidos fusionados a secuencias peptídicas adicionales u otras proteínas o fragmentos de proteínas o dominios. La célula hospedadora puede ser opcionalmente al menos una seleccionada de E. coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insectos o de plantas, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de los mismos.

Los péptidos o polipéptidos terapéuticos modificados y/o constructo de péptido-enlazador incluyen grupos reactivos que pueden reaccionar con funcionalidades reactivas disponibles en la fracción de extensión de vida media para formar un enlace covalente. Los grupos reactivos son grupos químicos capaces de formar un enlace covalente. Los grupos reactivos generalmente pueden ser carboxilo, fosforilo, un grupo acilo, éster o anhídrido mixto, maleimida, imidato, piridina-2-il-disulfanilo, por lo tanto capaz de formar un enlace covalente con funcionalidades tipo grupo amino, grupo hidroxilo, grupo carboxilo o un tiol grupo en el sitio diana de la albúmina o dominio Fc. Grupos reactivos de particular interés para ligarse a una albúmina incluyen grupos que contienen maleimido-y grupos que contienen piridina-2-il-disulfanilo.

Funcionalidades son grupos en albúmina o dominio Fc con los que los grupos reactivos en péptidos o polipéptidos modificados son capaces de reaccionar con para formar enlaces covalentes. Funcionalidades incluyen grupos hidroxilo para la unión con entidades éster-reactivas, grupos tiol para reaccionar con maleimidas, grupos que contienen maleimido o piridina-2-ildisulfanilo, imidatos y grupos tioéster; grupos amino para la unión a ácido carboxílico, grupos fosforilo, grupos acilo; y grupos carboxilo para reaccionar con hidrazina, hidrazida o hidroxilamina.

Los esquemas 1 a 3 describen la síntesis del constructo péptido-enlazador en donde el péptido es un péptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV.

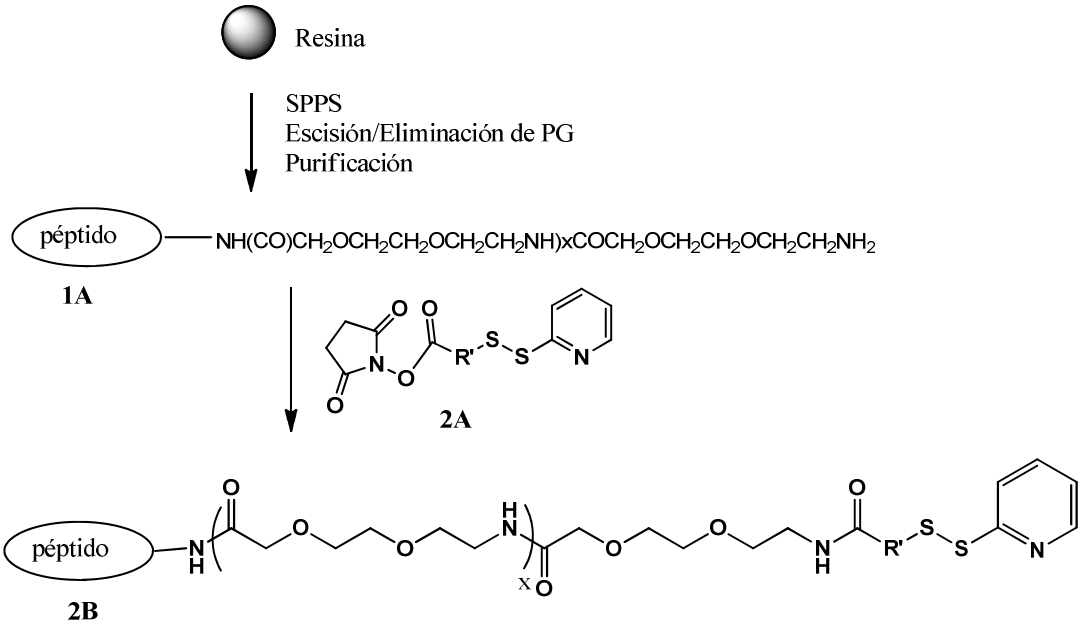
Esquema 1 describe la síntesis de un enlazador que contiene maleimida unido al extremo N-terminal de un polipéptido de las fórmulas I a IV.



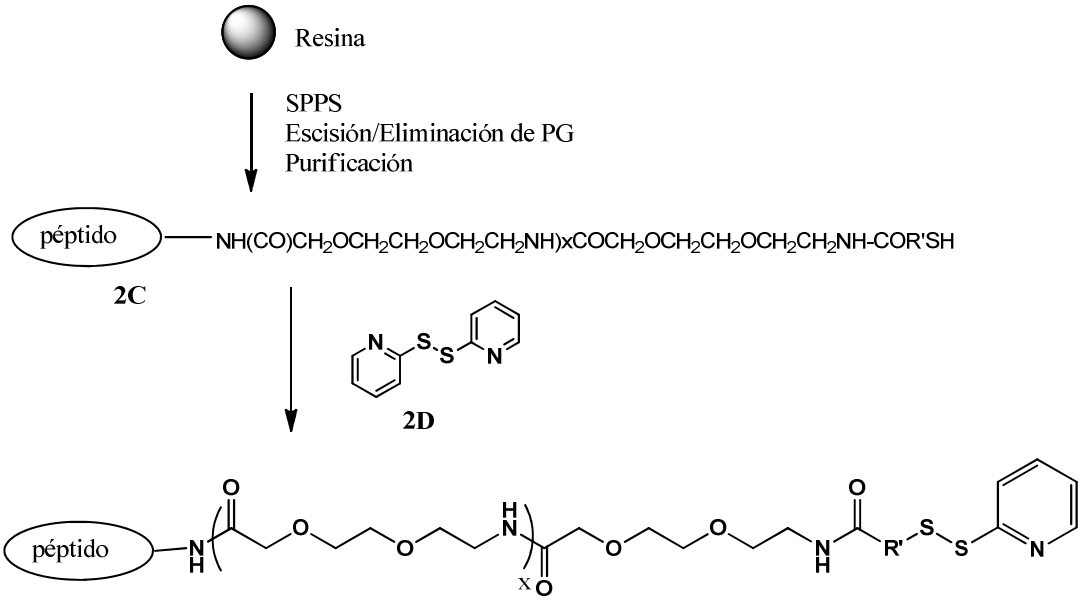
Esquema 1

El extremo N-terminal del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos O2Oc (x es 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10 y más preferiblemente de 3 a 6) de acuerdo con la bien establecida química de acoplamiento de amidas para generar (1A). La funcionalidad amino terminal de (1A) se hace reaccionar con un ácido activado (1B) en la que R es alquileno lineal o ramificado, arilo, heteroarilo, cicloalquilo o combinación de los mismos, con el fin de generar el péptido-maleimida que contiene constructo enlazador (1C). El ácido activado (1B) está disponible comercialmente o fácilmente disponible a partir de su ácido carboxílico correspondiente de acuerdo con la técnica conocida por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. Preferiblemente, R es un alquileno lineal, y más preferiblemente R es-CH_2-CH_2-. Alternativamente, para los péptidos que contienen una funcionalidad amino en la cadena lateral (por ejemplo péptido que contiene una lisina), grupo protector ortogonal tal como Alloc se requiere antes de la reacción de acoplamiento, seguido por el paso de desprotección adicional con el fin de obtener (1C).

Esquema 2A y 2B describen la síntesis de piridina-2-il-disulfanilo que contiene enlazador unido al extremo N-terminal de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I a IV.



Esquema 2A

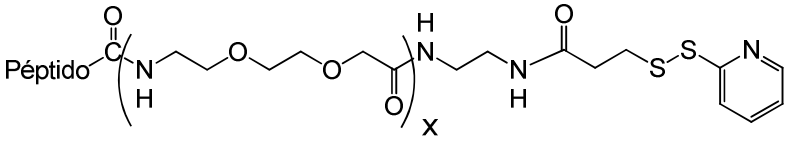


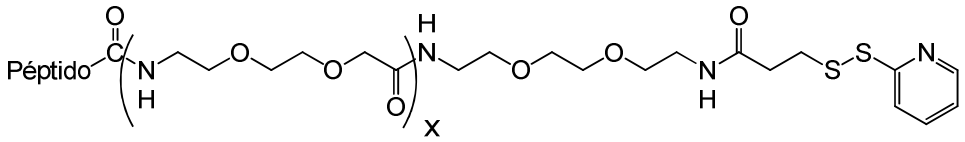
Esquema 2B

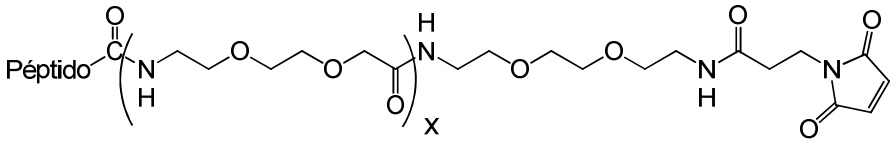
El constructo péptido-enlazador (1A) se prepara como se describe en el Esquema 1 y se hace reaccionar adicionalmente con un ácido activado de la fórmula (2a) en la que R' es un alquileno lineal o ramificado, para generar un péptido-piridina-2-il-disulfanilo que contiene el

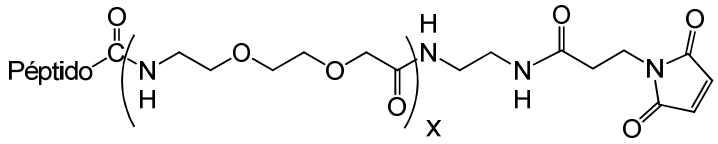
constructo enlazador (2B). El ácido activado (2A) está disponible comercialmente o fácilmente disponible a partir de su ácido carboxílico correspondiente de acuerdo con técnicas conocidas por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. Preferiblemente, R' es-CH_2-CH_2-. Alternativamente, el constructo de péptido-enlazador (2C) se puede preparar usando HO_2C-R'-SH, o una forma protegida del mismo (por ejemplo, grupos tritilo o Acm, lo que requiere etapas de desprotección adicionales), y se hace reaccionar adicionalmente con (2D) para generar péptido-piridina-2-il-disulfanilo que contiene el constructo enlazador (2B).

Grupos reactivos similares están unidos al extremo C-terminal del péptido de una manera similar a la descrita en los Esquemas 1, 2A y 2B usando una unidad diamino tal como por ejemplo –NH-CH_2CH_2-NH- o –NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-. Ejemplos no limitantes de tales constructos péptido enlazador son:

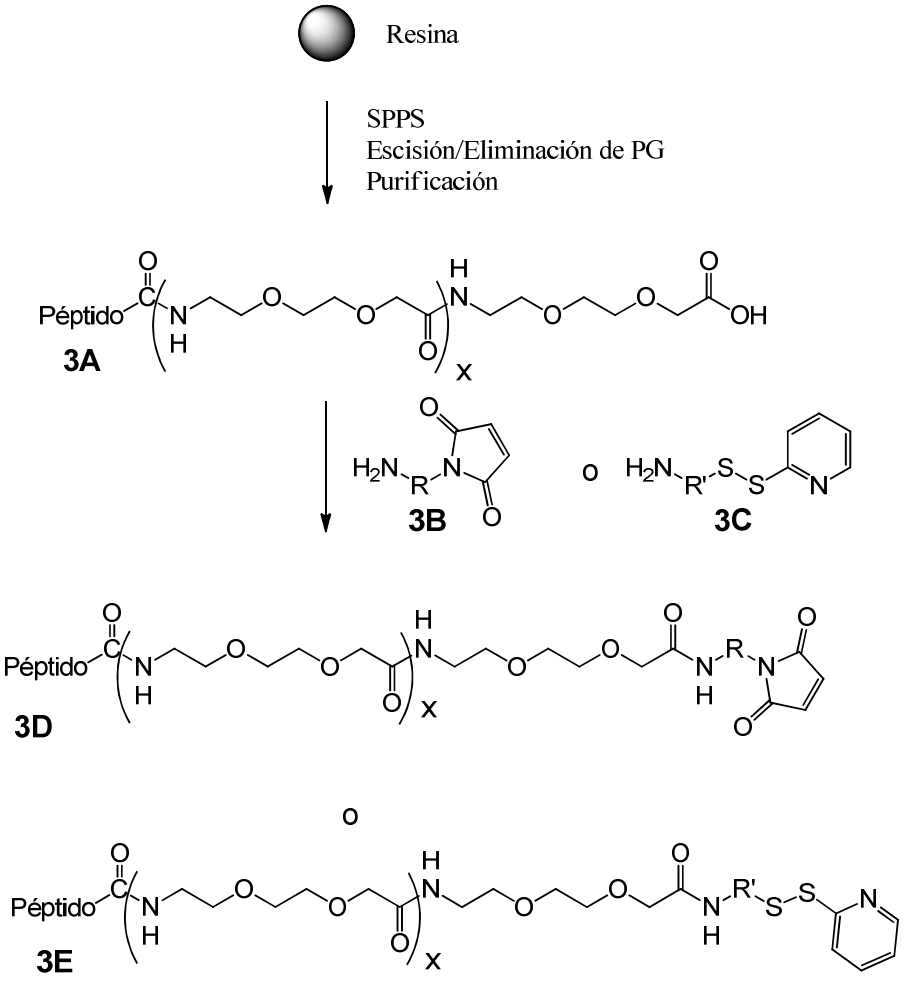








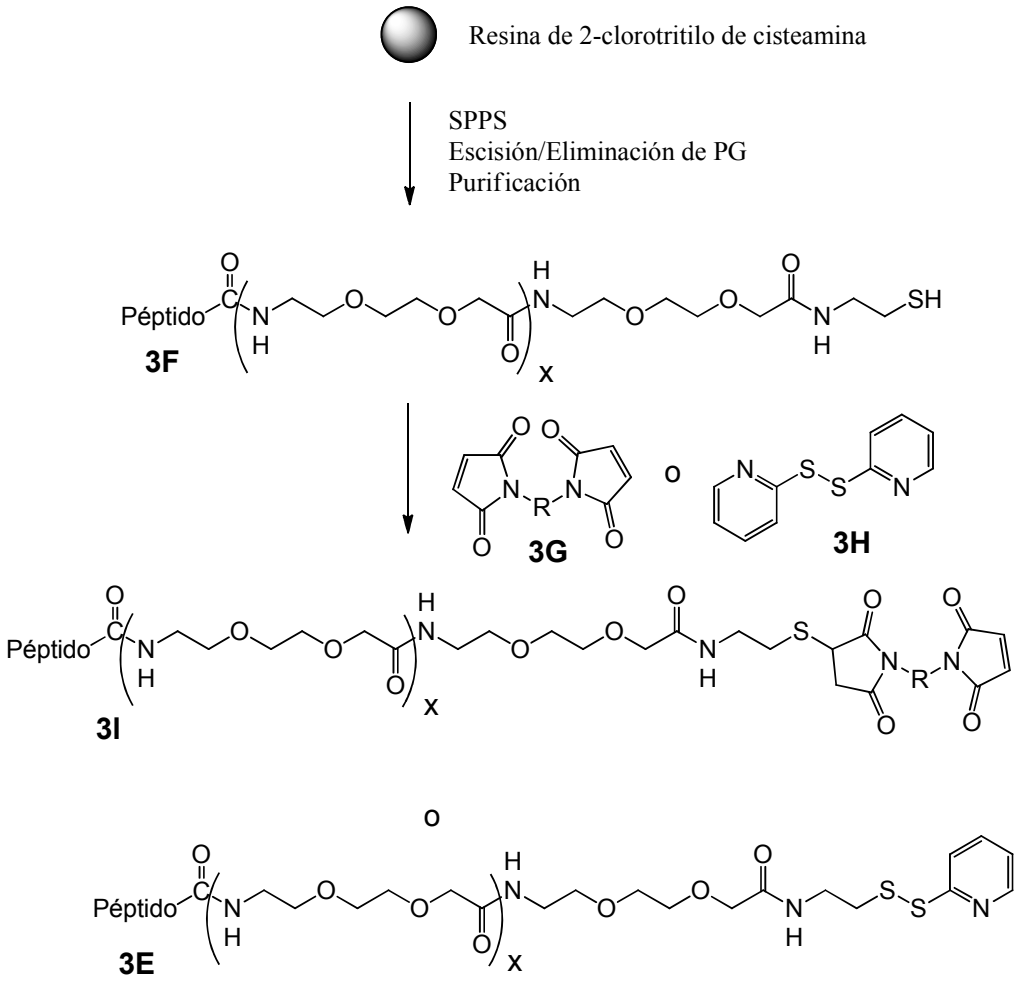
Alternativamente el grupo reactivo de maleimida o piridina-2-il-disulfanilo puede estar unido a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV de acuerdo con el Esquema 3A, 3B y 3C:



Esquema 3A

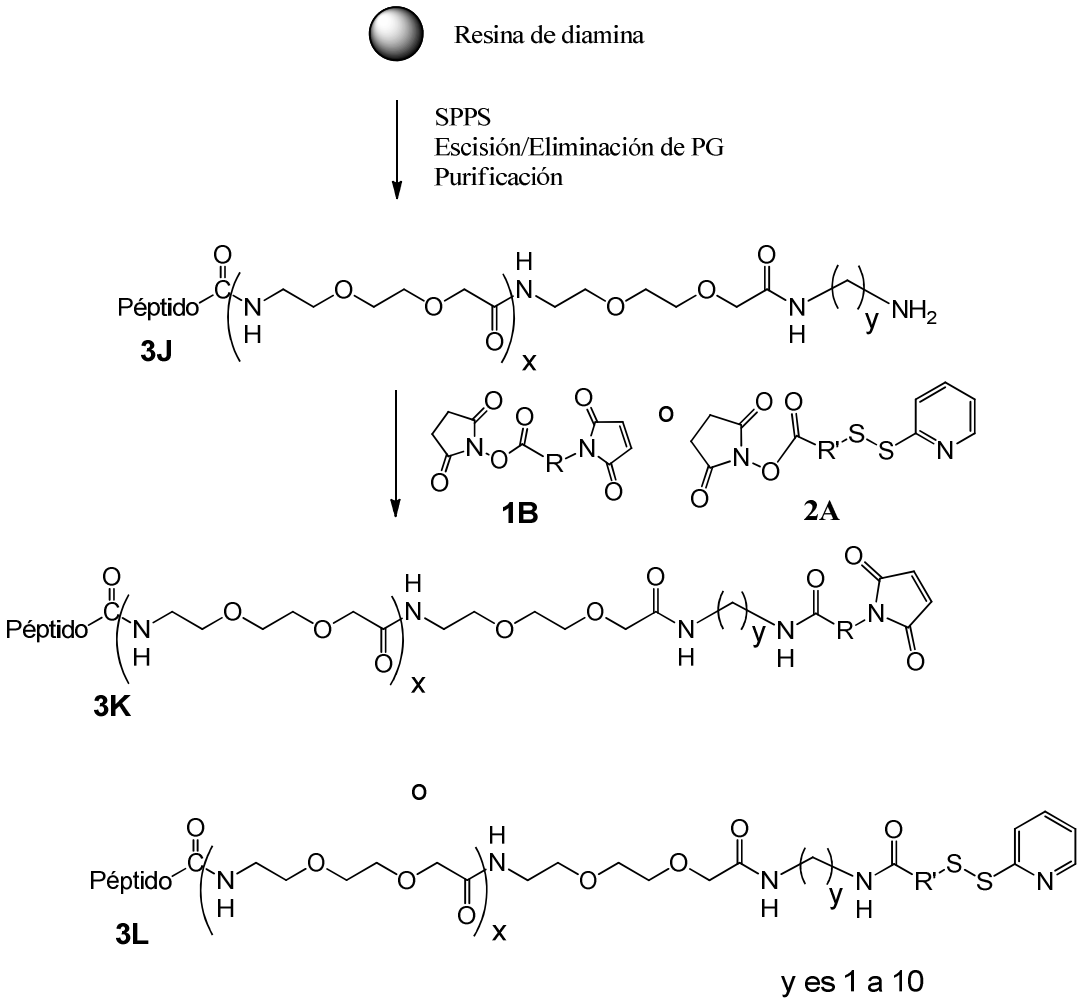
El grupo de ácido carboxílico en el extremo C-terminal del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos O2Oc utilizando condiciones de acoplamiento de amida estándar para generar (3A). La funcionalidad de ácido carboxílico terminal reacciona con el grupo amino de (3B) o (3C) en donde R y R' son como se define anteriormente, con el fin de generar los constructos activados péptido enlazador (3D) o (3E). Adicionalmente, cuando un péptido contiene una cadena lateral de funcionalidad carboxilo (por ejemplo, Glu o Asp), se

requieren grupo protector ortogonal (por ejemplo, O-alilo) y etapas de desprotección adicionales.



Esquema 3B

El constructo péptido-enlazador 3F se puede obtener utilizando una resina de cisteamina 2-clorotritilo y después se hace reaccionar con 3G o 3H para generar con constructo péptido-enlazador 3I o 3E, respectivamente.

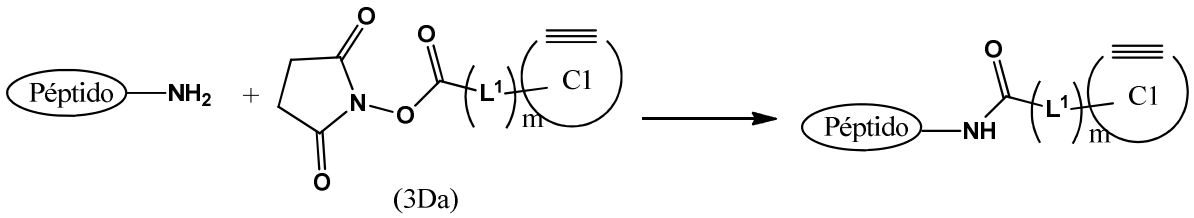


Esquema 3C

El constructo péptido-enlazador (3J) puede obtenerse a partir de una resina de diamina y se hace reaccionar adicionalmente con (1B) o (2A) para generar un constructo péptido-enlazador de la Fórmula (3K) o (3L), respectivamente.

Los Esquemas 1 a 3C describen constructos péptido-enlazador, más particularmente para su uso en la preparación de un bioconjugado con albúmina. El grupo reactivo de maleimida y el grupo reactivo de piridina-2-il-disulfanilo reacciona con la funcionalidad SH de la cisteína 34 de la albúmina.

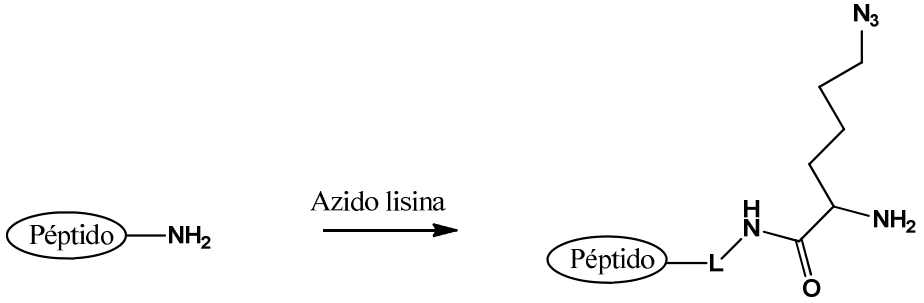
Los esquemas 3D y 3E describen la preparación de constructos péptido-enlazador para uso en una cicloadición de Huisgen azida alquino, más comúnmente conocido como química click.



(3Da)

Esquema 3D

en donde m es 0 o 1, C1 es un sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico, mono, di o tricíclico opcionalmente sustituido con flúor, L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en el que la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= O), y en el que uno o más carbono se sustituye con O o NH. Las fracciones de cicloalquino (3DA) están fácilmente disponibles en el mercado. Además, el alquino cíclico en la química clic para el etiquetado de proteínas ha sido descrito en EE.UU. 2009/0068738, que se incorporan en la presente como referencia. Ejemplos específicos se han descrito a continuación (ejemplo 20). La manija clic puede ser introducida en el extremo N-terminal del péptido o en una cadena lateral de residuos de lisina.

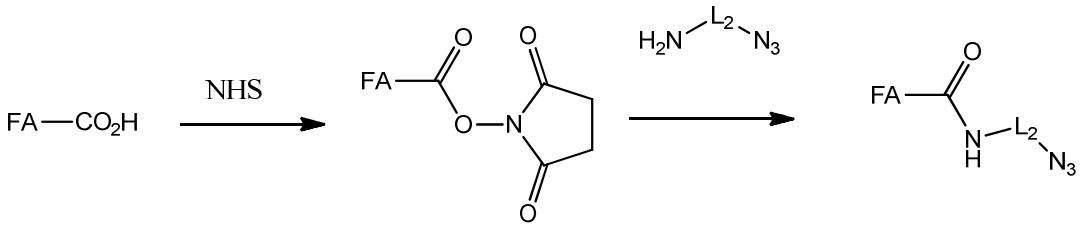


Esquema 3E

El esquema 3E describe la introducción de un residuo de lisina azido en el extremo N-terminal de un péptido de apelina opcionalmente a través de un enlazador L (tal como por ejemplo uno o más aminoácidos seleccionados entre glicina y serina). La funcionalidad azida actúa como una manija química. Ejemplos específicos se han descrito en esta solicitud co-presentada, (Número de expediente PAT055418-US-PSP2).

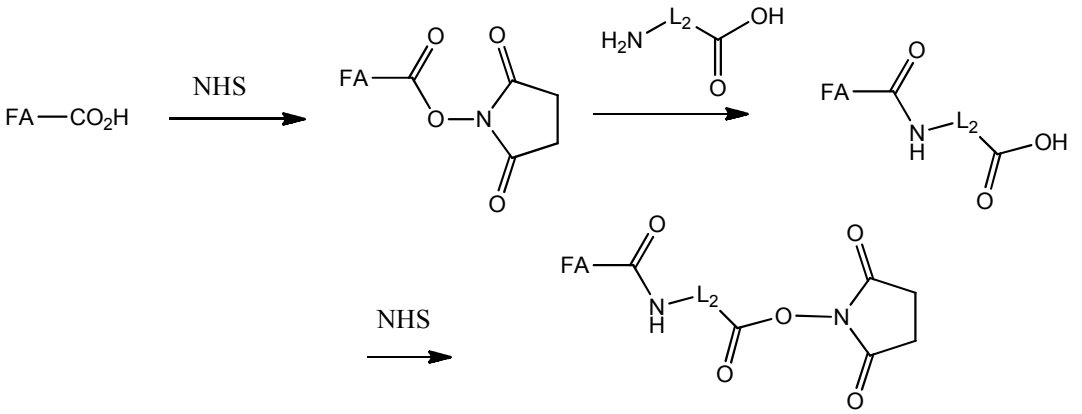
Preparación de constructo fracción-enlazador de extensión de vida media:

El Esquema 3F y 3G describe la preparación de un constructo de ácido graso-enlazador.



Esquema 3F

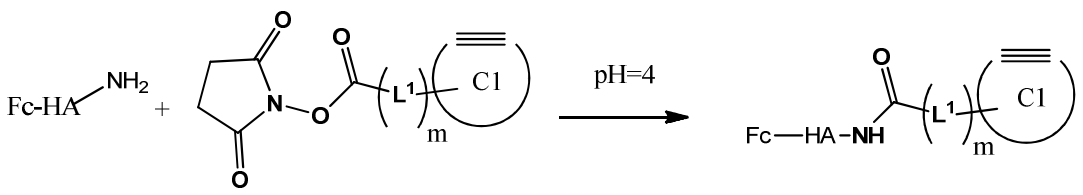
en donde FA es ácido graso, L2 es una fracción enlazadora(por ejemplo PEG), NHS es N-hidroxisuccinimida. Tales constructos de ácido graso- enlazador se utilizan para la conjugación utilizando química click. En los casos en donde el ácido graso contiene funcionalidades tales como grupos hidroxilo o ácido carboxílico adicional, puede ser necesaria la protección de dichas funcionalidades.



Esquema 3G

En donde FA, NHS y L2 se definen anteriormente en el Esquema 3F. Tales constructos de ácidos grasos se utilizan para la conjugación con una funcionalidad amino en el péptido, preferiblemente el extremo N-terminal.

El Esquema 3H describe la preparación de un constructo Fc-enlazador



Esquema 3H

AH-Fc es un constructo que contiene la secuencia AH- en el extremo N-terminal de la Fc. El constructo se prepara usando métodos recombinantes. La secuencia AH permite la modificación selectiva del extremo N-terminal a un pH bajo. Dicha modificación selectiva se divulga en solicitudes co-presentadas (solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015868: número de expediente PAT056275-US-PSP y solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015862: PAT056274-US-PSP). Por lo tanto, el clic mango se introduce en el extremo N-terminal del constructo Fc.

En aún otra realización, el constructo Fc se modifica en el extremo C para introducir un pequeño motivo de reconocimiento de sortasa (LPXTG/A).

Tal motivo de reconocimiento Fc se prepara usando métodos recombinantes. Un ejemplo de tal constructo es: Fc-[GGGG]n-LPETGGLEVLFQGP (SEQ ID NO: 15) en donde el péptido GGLEVLFQGP (SEQ ID NO: 16) es cortado durante el tratamiento con sortasa.

Preparación de la Proteína de Fusión de Péptidos Fc APJ

La molécula multimerizada biológicamente generada, tal como un anticuerpo Fc que comprende al menos una parte de la región que contiene cisteína conocida como la bisagra puede prepararse a partir del producto de proteína expresado recombinante que se ha secretado en forma multimerizada (por ejemplo, dimérica). La presente invención también incluye proteínas de fusión Fc modificadas en donde la secuencia de aminoácidos de la región Fc se ha alterado con respecto a la secuencia de aminoácidos de la región Fc-o constante encontrada en un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, la proteína de fusión Fc puede ser modificada con mutaciones con el fin de obtener las características deseadas de afinidad de unión a FcRn y/o vida media en suero. Ejemplo de proteínas de fusión Fc modificadas se han descrito en la patente de EE.UU. número 7.217.798, que se incorpora como referencia.

Las proteínas de fusión Fc de esta invención también se pueden alterar sintéticamente, por ejemplo, por unión de la fracción enlazadora y la fracción de péptido o polipéptido. Además, las proteínas de fusión Fc "modificadas" con dominio Fc derivadas de anticuerpos recombinantes se pueden hacer en cualquier sistema de expresión incluyendo sistema de expresión procariota y eucariota o el uso de métodos de presentación de fagos.

Los constructos Fc-enlazador tales como Fc-[GGGGS] (SEQ ID NO: 14), Fc-[GGGGS]2 (SEQ ID NO: 13), Fc-[GGGGS]3 (SEQ ID NO: 12), Fc-GG y Fc-GS, se describen a continuación en la parte experimental. El [GGGGS] (SEQ ID NO: 14), [GGGGS]2 (SEQ ID NO:13), [GGGGS]3 (SEQ ID NO:12), GS y enlazador GG están unidos ya sea al extremo C del dominio Fc o al extremo N del dominio Fc, en donde Fc es un Fc nativo o una variante del mismo. Ejemplo de la variante Fc incluye un Fc en el que la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina. Tal variante Fc se han descrito en esta solicitud co-presentada, (Número de expediente PAT055781-US-PSP2).

Bioconjugados

En una realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV se conjuga (se fija químicamente / covalentemente) a la funcionalidad tiol de la cisteína 34 de la albúmina. En un aspecto de esta forma de realización, albúmina-péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina se conjuga (se une químicamente) al extremo N-terminal del péptido. En aún otra realización, albúmina-péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina se conjuga (se une químicamente) al extremo C-terminal del péptido.

En otra forma de realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de la Fórmula I a IV se fusiona a uno o más dominios de una región Fc de la IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se fija a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está involucrado en las funciones efectoras, como la activación del complemento y el ataque de las células fagocíticas. Un Fc tiene una larga vida media sérica, mientras que un Fab tiene una vida corta (Capon , 1989, Nature 337: 525-31). cuando se unen

(con un péptido o polipéptido terapéutico, un dominio Fc puede proporcionar vida media más larga (C. Huang, Curr. Opin. Biotechnol., 2009, 20, 692-699).

En una realización, el péptido Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo N-terminal del péptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV. En otra realización, el péptido-Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo C del péptido.

La región Fc puede ser una región Fc de origen natural, o se puede modificar para mejorar ciertas cualidades, como las cualidades terapéuticas, el tiempo de circulación, o la agregación reducida.

Modificaciones útiles de los agentes terapéuticos por fusión con el dominio "Fc" de un anticuerpo son discutidos en detalle en la Publicación PCT No. WO 00/024782. Este documento discute la unión a un "vehículo" tal como glicol de polietileno (PEG), dextrano, o una región Fc.

Las realizaciones preferidas de la invención son bioconjugados que comprenden un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones anteriores y una fracción de extensión de vida media, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc fusionado a un polipéptido de la Fórmula I, III, IV o V a través un enlazador. En un aspecto de esta invención, el enlazador tiene la siguiente fórmula:

- [GGGGS] n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 7) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural. Ejemplos de polipéptidos de la Fórmula I, II, III o IV adecuado para la fusión con el dominio Fc son: QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO:8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO:9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO:10). Un aspecto preferido de esta realización son péptidos Fc bioconjugados fusionados como se define anteriormente, que comprende un fragmento Fc modificado (por ejemplo, un FcLALA) y un péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV, como se define en la presente.

En aún otra realización, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisana del extremo C ha sido eliminada o sustituida por alanina.

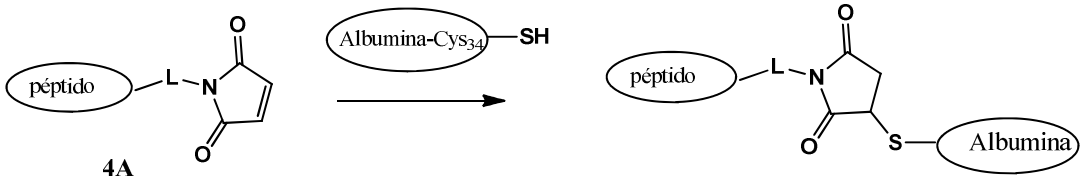
Se ha encontrado que los péptidos fusionados a una región Fc exhiben una vida media sustancialmente mayor in vivo que sus contrapartes sin fusionar. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido.

En otras realizaciones de la invención están los bioconjugados que comprende un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-IV y una fracción de extensión de vida media, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que se une químicamente a un polipéptido.

Preparación de Conjugados:

Los esquemas 4 y 5 ilustran las reacciones químicas para la conjugación de un péptido agonista de APJ o un péptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV y una fracción de extensión de vida media, tales como un dominio Fc o albúmina.

El esquema 4 ilustra la conjugación de un péptido enlazador de la Fórmula 4A con cisteína 34 de albúmina

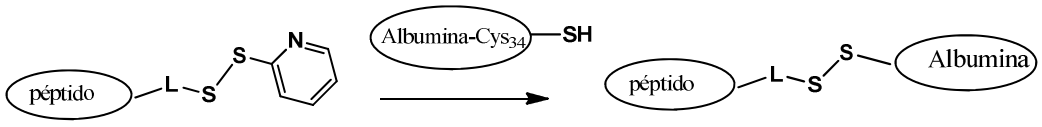


4A

Esquema 4

en donde L representa una fracción enlazadora entre el péptido y la funcionalidad de maleimida. En una realización particular, L es una fracción enlazadora como se divulgó en el Esquema 1, 3A, 3B o 3C.

El esquema 5 ilustra la conjugación de un constructo péptido enlazador de la Fórmula 8A con cisteína 34 de albúmina

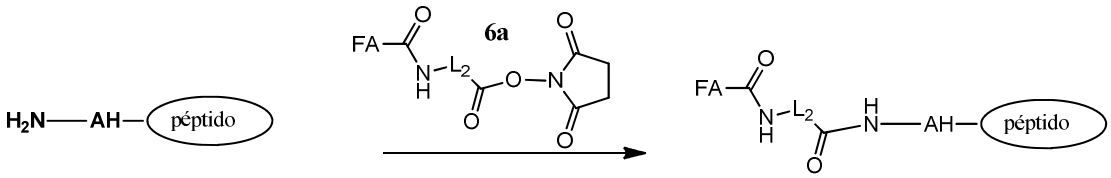


5A

Esquema 5

en donde L representa una fracción enlazadora entre el péptido y la funcionalidad –S-S-piridina. En una realización particular, L es una fracción enlazadora como se divulgó en los Esquemas 2, 3A, 3B o 3C.

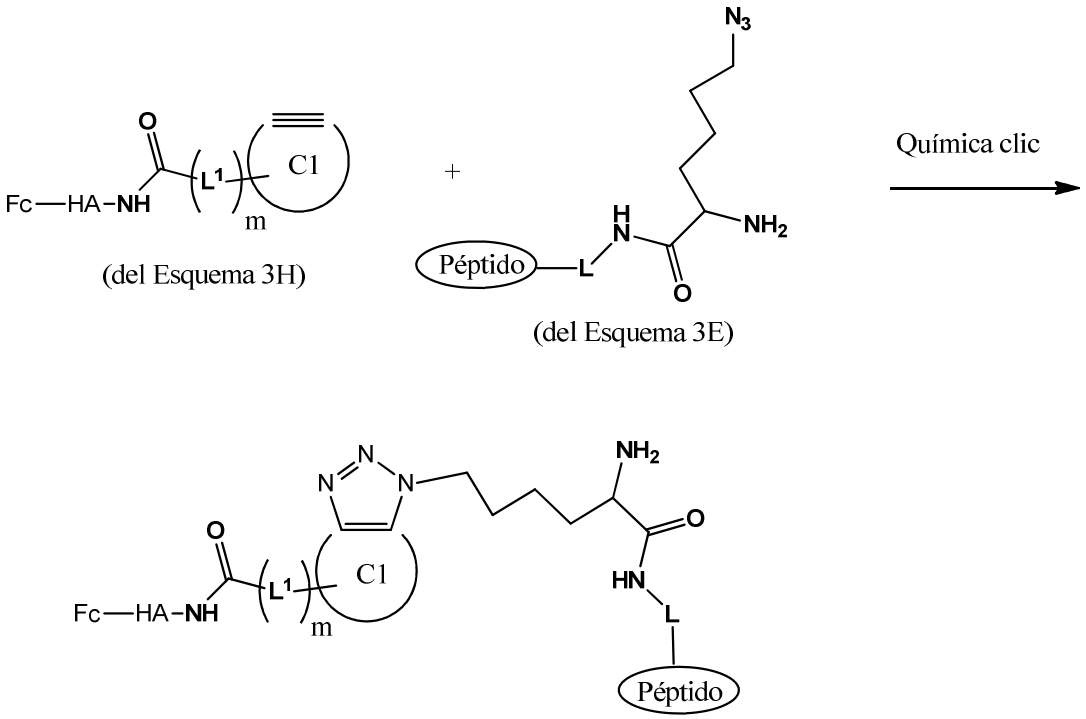
Otro método de conjugación se ha descrito en la solicitud co-pendiente y co-presentada (solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015862: números de expediente PAT056274-US-PSP, solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015868: PAT056275-US-PSP y solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015848: PAT055781-US-PSP02). Tal método incluye N-acilación selectiva de un péptido y se resume en el Esquema 6.



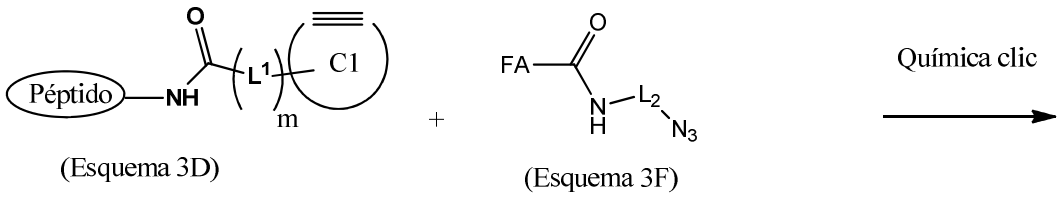
Esquema 6

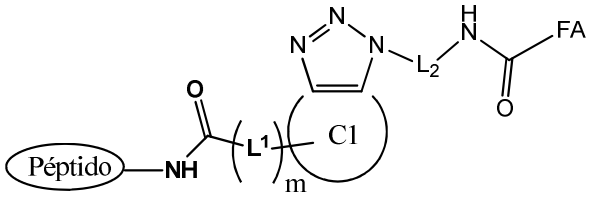
en donde AH es un enlazador introducido en el extremo N del péptido para facilitar la reacción en el extremo N-terminal, H es histidina, A es alanina, FA es un ácido graso como se describió anteriormente, por ejemplo, un ácido graso de la fórmula A1 a A3 , y L es una fracción enlazadora (por ejemplo, una fracción enlazadora PEG). El constructo 6a de ácido graso-enlazador (preparado como se muestra en el Esquema 3G) se introduce selectivamente en el péptido en el extremo N-terminal cuando se utilizan condiciones de pH bajo. Dicho método se ha descrito en solicitudes de patentes co-presentadas (solicitud provisional EE.UU. No. 62/015868: número de expediente PAT056275-US-PSP y solicitud provisional EE.UU. No. 62/015848 PAT055781-US-PSP02).

Los esquemas 7 y 8 describen la formación de conjugados de acuerdo con la presente invención usando química clic.



Esquema 7



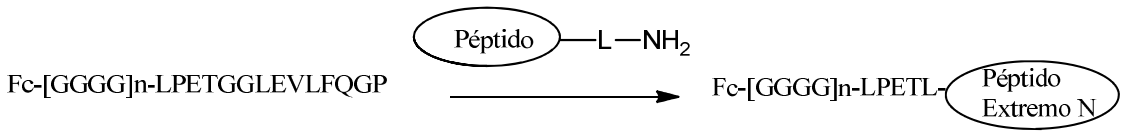


Esquema 8

Los métodos para preparar conjugados y constructos péptido-enlazador en los Esquemas 1-5 También se han descrito y ejemplificado en solicitudes EE.UU. co-presentadas (solicitud provisional de EE.UU. No. 61/858 251: números de expediente: PAT055326-US-

PSP3 y solicitud provisional de EE.UU. No. 61/858303:PAT055781-US-PSP) que se incorporan en la presente como referencia.

El esquema 9 describe la conjugación de un péptido APJ con un constructo Fc que utiliza una enzima de sortasa



en donde n es 1, 2 o 3, L es un enlazador opcional es (por ejemplo un enlazador de poliglicina)

(SEQ ID NOS 17 y 11, respectivamente, en orden de aparición)

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, pueden administrarse en cualquiera de una variedad de maneras, incluyendo por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por inhalación, por vía oral, etc. Las realizaciones particularmente preferidas de la invención emplean la administración intravenosa continua de los polipéptidos de la presente invención, o una amida, éster, o sal del mismo o un bioconjugado de los mismos. Los polipéptidos o bioconjugados de la presente invención se pueden administrar como un bolo o como una infusión continua durante un período de tiempo. Se puede utilizar una bomba implantable. En ciertas realizaciones de la invención, la administración intermitente o continua de polipéptidos o bioconjugados se continúa durante uno o varios días (por ejemplo, 2-3 o más días), o por períodos más largos de tiempo, por ejemplo, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido se proporciona durante al menos 3 días aproximadamente. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido o bioconjugado se proporciona durante al menos una semana aproximadamente. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido o bioconjugado se proporciona durante al menos dos semanas aproximadamente. Puede ser deseable mantener una concentración plasmática promedio del polipéptido por encima del valor del umbral determinado, ya sea durante la administración o entre la administración de dosis múltiples. Una concentración

deseable se puede determinar, por ejemplo, sobre la base de la condición fisiológica del sujeto, gravedad de la enfermedad, etc. dichos valores deseables se pueden identificar mediante la realización de ensayos clínicos estándar. Alternativamente, los peptidos y conjugados de los mismos pueden entregarse por vía oral a través de un mecanismo FcRn. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262–G270, 2013).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la presente invención o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado de los mismos, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede formularse para rutas particulares de administración tales como administración oral, administración parenteral, y administración rectal, etc. Además, la composiciones farmacéuticas del presente invento pueden integrarse en una forma sólida (incluyendo sin limitación cápsulas, tabletas, píldoras, gránulos, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo sin limitación soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como ésterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes lubricantes, o agentes amortiguadores, así como también adyuvantes, tales como preservativos, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores y buffers, etc.

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

Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o tampón de fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista fácil inyectabilidad. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben preservar con la acción de contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol de propileno, y glicol de polietileno líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo, mediante el uso de un cubierta tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de particula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La

prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios son ventajosamente preparados a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden ser ésterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes preservantes, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o buffers. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones son preparadas según métodos convencionales de mezclado, granulación o revestimiento, respectivamente, y contienen 0.1-75% aproximadamente, o contienen 1- 50% aproximadamente, del ingrediente activo.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de ésterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril previamente filtrada de los mismos.

Composiciones orales generalmente 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 utilizar en la forma de comprimidos, grageas, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un vehículo de flujo para utilizar como un enjuague bucal. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas 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 agtente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o estearatos; un deslizante como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa y/o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Formulaciones para adminstración oral pueden ventajosamente incorporar agentes para mejorar estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/ o para mejorar la absorción.

Para administración por inhalación, los agentes terapéuticos inventivos son preferiblemente liberados en la forma de un espray en aerosol a partir de un contenedor presurizado o dispensador que contiene un propelente apropiado, ej., un gas tal como dioxido de carbono, o un nebulizador. Se nota que los pulmones proporcionan una gran superficie de área para administración sistémica de agentes terapéuticos.

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

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos.

Composiciones apropiadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un polipéptido de la invención con un vehículo apropiado. Vehículos apropiados para liberación transdérmica incluyen solvatos farmacológicamente aceptables absorbentes para asistir en el pasaje a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en la forma de un vendaje que comprende un miembro de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera controladora de tasa para liberar el compuesto de la piel del huésped a una tasa controlada y predeterminada durante un periodo de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

Composiciones apropiadas para aplicación tópica, *ej.*, a la piel y ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones en atomizador, *ej.*, para liberación mediante aerosol o similares. Tales sistemas tópicos de liberación serán apropiados en particular para aplicación dérmica. Por lo tanto son particularmente apropiados para utilizar en formulaciones tópicas incluyendo formulaciones cosméticas bien conocidas en el estado de la técnica. Tales pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes mejoradores de tonicidad, buffers y preservativos.

Como se utiliza en la presente una aplicación tópica también se refiere a una inhalación o a una aplicación intranasal. Estas pueden ser convenientemente liberadas en la forma de un polvo seco (bien sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o como partículas de componentes mixtos, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, atomizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente apropiado.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la tasa mediante la cual el compuesto del presente invento como un ingrediente activo se descompondrá. Tales agentes, los cuales se conocen en la presente como "estabilizadores," incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, buffers de pH, o buffers de sales, etc.

Tal como se utiliza en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de los polipéptidos de esta invención y, que normalmente no son biológicamente o de otro modo indeseables. En muchos casos, los polipéptidos de la presente invención son capaces de formar sales ácidas y/o alcalinas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, ej., sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/hidrobromuro, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfornato, cloruro/hidrocloruro, clorteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mielato, misilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de

hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y sales de trifluoroacetato.

Ácidos inorgánicos a partir de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido hidrobrómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

Ácidos orgánicos de tales sales pueden derivarse incluyendo, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maléico, ácido manólico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las Sales de adición alcalina farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

Bases inorgánicas a partir de las cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, sales y metales de amonio de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; sales particularmente apropiadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Bases orgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de ocurrencia natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio de iones alcalinos, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen esopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir de un compuesto precursor, una fracción alcalina o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse al reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tales como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K o similares), o al reaccionar formas alcalinas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Típicamente, tales reacciones se realizan en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, el uso de medios no acuosos tipo éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo es deseable, donde pueda realizarse. Listas de sales apropiadas adicionales pueden encontrarse, ej., en "*Remington's Farmaceutical Sciences*", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "*Handbook of Farmaceutical Salts:*

Properties, Selection, and Use" de 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, surfactantes, antioxidantes, preservativos (ej., agentes antibacterianos , agentes antimicóticos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, preservativos, fármacos, fármacos estabilizadores, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, edulcorantes, agentes sapófiros, tintes, y similares y combinaciones de los mismos, como se conocerá por aquellos con experiencia en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Excepto en lo que respecta a cualquier vehículo convencional incompatible con el ingrediente activo, su uso es contemplado en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Método de la Invención:

La familia de apelina de peptidos es la única familia natural conocida de ligados para el receptor APJ acoplado a proteína G. El gen de Apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, el cual se transforma en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12 y una forma modificada de la apelina-13 con piroglutamato (Pyr^1-apelina-13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, tras la unión al receptor APJ, se transduce la señal a través de proteínas Gi y Gq. En cardiomiocitos, el acoplamiento Gi o Gq conduce a cambios en el pH intracelular, la activación de PLC, y la producción de IP3 que mejoran la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y en última instancia resulta en aumento de la contractilidad cardiaca. El acoplamiento Gi inhibe el Gs activado, la adenilato ciclasa y la producción de cAMP y aumenta los niveles pAkt que conducen a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, la activación de APJ a través de Gi, pAKT conlleva a la producción aumentada de óxido nítrico (NO), que aumenta el relajamiento del músculo liso que resulta en vasodilatación generalizada.

Los pacientes con insuficiencia cardiaca crónica estable tienen episodios agudos de descompensación ocasionales, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más y los síntomas empeoran. Estas exacerbaciones se conocen como la insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD). Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos,

vasodilatadores e inotrópicos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendan) son bien conocidos por sus efectos adversos tales como arritmias y mortalidad a largo plazo aumentada. Análogos sintéticos del polipéptido apelina de la presente invención, o bioconjugado de los mismos, proporcionan una terapia para la falla cardiaca aguada descompensada (ICAD) que incrementa la contractilidad cardíaca sin complicaciones arritmogénicas o mortalidad y apunta a una enorme necesidad médica en la insuficiencia cardíaca crónica.

De hecho, el tratamiento agudo apelina (5 min) en seres humanos resultados en la vasodilatación coronaria y mejora el gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben un t ½ muy corto (segundos) y la duración de la acción (pocos minutos) in vivo. Análogos potentes sintéticos del polipéptido Apelina de la presente invención, o bioconjugado de los mismos, tienen una vida media más larga en comparación con la apelina nativa.

La activación del receptor APJ en cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardiaca a través de Gi / Gq, PLC y Ca2 +, y b) proporciona cardioprotección a través de Gi, la activación pAkt, pero sin aumentar el cAMP (como se ve con otros inotrópicos). Además, el agonismo APJ en las células endoteliales conduce a la vasodilatación arterial, que beneficia adicionalmente a la insuficiencia cardíaca sin sobre cargar el ventrículo izquierdo. Tomados en conjunto los análogos sintéticos del polipéptido Apelina pueden mejorar la función cardíaca general, reducir la arritmogénesis y proporcionar un beneficio de supervivencia.

Más recientemente, ha habido un número de publicaciones de investigación preclínicas centradas en la posible participación de la apelina en la diabetes y la resistencia a la insulina. La apelina ha demostrado que 1) baja los niveles de glucosa en la sangre mediante la mejora de la captación de glucosa en el músculo, tejido adiposo y corazón, 2) protege a las células beta pancreáticas del estrés ER y apoptosis posterior, 3) disminuye la secreción de insulina en las células beta, y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en el tejido adiposo. La activación de la vía de pAKT ha sido implicada en estos procesos.

Los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, o un bioconjugado de los mismos, exhiben propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor de APJ, por ejemplo, como se indica en

las pruebas in vitro e in vivo como se dispone en las siguientes secciones y por lo tanto se indican para terapia.

Los polipéptidos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o bioconjugados de los mismos, pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, la fibrosis cardiaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), la obesidad, la enfermedad arterial periférica, los accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol) y la preeclampsia.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para el tratamiento de una enfermedad que se asocia con la actividad del receptor APJ. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista antes mencionada, apropiadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda. En aún otro subconjunto de esta realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de una enfermedad que se asocia con la actividad del receptor APJ.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que puede ser tratada mediante la activación (agonista) del receptor de APJ.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo. En una

realización adicional, la enfermedad se selecciona de la lista antes mencionada, adecuadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

En aún otro subconjunto de esta realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que responde al agonismo del receptor APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

La cantidad eficaz de una composición o combinación farmacéutica de la invención a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento por lo tanto variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la que se está utilizando la variante de proteína de fusión, la vía de administración, el peso y el tamaño (cuerpo , superficie corporal, o tamaño del órgano) y condición (la edad y salud general) del paciente. En consecuencia, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre 0,1 µg/kg hasta aproximadamente100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación pueden oscilar entre 0.1 µg/kg y 100 mg/kg aproximadamente; o 1 µg/kg hasta 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de función dual en la formulación que se utiliza. Por lo general, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación para lograr el efecto deseado. La composición por lo tanto, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implante o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación adecuada es realizado de manera rutinaria por los expertos en el estado de la técnica y se encuentra dentro del ámbito de las tareas de rutina realizadas por ellos. Las dosis apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos apropiados dosis-respuesta.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un polipéptido de la presente invención o un bioconjugado del mismo, se refiere a una cantidad del polipéptido de la presente invención (o bioconjugado) que producirá la respuesta biológica o médica de un

sujeto, por ejemplo, mejora de un síntoma, alivio de una condición, retardo o disminución la progresión de la enfermedad, o prevención de una enfermedad, etc. En una realización 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) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una condición, o un trastorno o una enfermedad o un síntoma de la misma (i) aliviada por la activación del receptor APJ, o (ii) asociada con actividad del receptor APJ, o (iii) caracterizada por actividad anormal del receptor APJ; o (2) activar el receptor APJ.

En otra realización 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, tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es eficaz, al menos parcialmente activar el receptor APJ. Como se preciará por los expertos en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que es efectiva puede variar dependiendo de tales factores como el fin biológico deseado, el agente a ser liberado, el tejido diana, etc. Aquellos con experiencia común en la técnica entenderán que “una cantidad terapéuticamente efectiva” puede administrarse en una única dosis o puede lograrse mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar insuficiencia cardiaca, una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para resultar en la mejora clínica del paciente, ej., tolerancia/capacidad de ejercicio aumentada, presión sanguínea aumentada, retención de fluidos disminuida, y/o resultados mejorados en una prueba cuantitativa del funcionamiento cardiaco, ej., la fracción expulsada, capacidad de ejercicio (tiempo hasta estar 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 a por ejemplo, primates (*ej.*, humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En aún otras realizaciones, el sujeto es un humano.

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

Como se utiliza en la presente, el término “tratar”, o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es

decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización “tratar” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (*ej.*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (*ej.*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en la presente, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia, comienzo, o desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resulta de la administración de una terapia (ej., un agente terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (ej., una combinación de agentes terapéuticos).

Como se utiliza en la presente, un sujeto esta “en necesidad de” un tratamiento si tal sujeto se beneficia biológicamente, médicamente o mejora su calidad de vida a partir de tal tratamiento.

Como se utiliza en la presente, el término "un,” "una,” "el”, “los” y términos similares se utilizan en el contexto del presente invento (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) para cubrir formas tanto singulares como plurales a menos que se indique lo contrario o claramente sea contradicho por el contexto.

Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.,* "tal como”) proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor el invento y no implica limitación sobre el alcance del invento de otra manera reivindicado.

La actividad de un polipéptido según la presente invención puede evaluarse mediante los siguientes métodos *in vitro & in vivo* descritos más adelantes.

Ensayo de flujo de calcio de hAPJ:

Se sembraron células estables Chem.-5 de APJ (Millipore # HTS068C) en un placa de 384 pozos con 10.000 células / pozo en 25 µl de medio de cultivo, luego se cultivaron durante 24 horas en una incubadora de tejido a 37 ° C. Una hora antes del ensayo, se agregó 25 µl /

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 tejidos a 37 °C. Los péptidos se disolvieron en HBSS, HEPES y buffer BSA al 0,1%, y se diluyeron serialmente 10 veces, desde 50 uM hasta 5 pM por triplicado. Se utilizó Tetra FLIPR para agregar péptido a las células con colorante (1:5, para concentraciones peptidicas finales que van desde 10 uM a 1 pM). El tinte FLIPR dentro de las células emite fluorescencia tras la unión al calcio, mientras que la fluorescencia de fuera de las células es enmascarada. La fluorescencia se midió utilizando ondas de longitud de 470-495 de excitación y 515 a 575 de emisión en el FLIPR Tetra. Las lecturas se realizaron durante 3 minutos en total, comenzando 10 segundos antes de la adición de péptidos. Se calcularon los valores máximos y mínimos y se representaron gráficamente para cada concentración de péptido, y el software GraphPad prism se utilizó para calcular los valores EC_{50} en los puntos de inflexión de la curva, para la estimulación de flujo de calcio por péptidos.

Ensayo de la estabilidad del plasma:

Materiales:

Solución de Trabajo: El objeto de la muestra se preparó a 1 mg / ml en agua Milli-Q

Extraction solution: Metanol: Acetonitrilo: Agua (1:1:1) con ácido Fórmico al 0,1% y 400 ng / ml de Gliburida.

Plasma: El plasma de ratas Sprague-Dawley macho (con heparina de sodio), comprado de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York).

Sangre entera: Sangre entera de Sprague-Dawley macho (con heparina de sodio), comprado de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York).

Homogeneizado de Pulmón: El pulmón de ratas Sprague-Dawley macho se compró de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York). El pulmón se homogeneizó utilizando un homogeneizador Polytron después de la adición de 5x el volumen de 1X PBS. El homogenato se centrifuge a 9000 rpm durante 10 min at 4 °C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 30 min para hacer un sobrenadante claro. La concentración de proteína se determinó utilizando un kit comercial (Pierce, Thermo Scientific).

Muestra del procedimiento de preparación: (péptidos)

El artículo de prueba se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: El plasma de rata heparinizada, sangre entera heparinizada o homogeneizado de pulmón de rata. La muestra de plasma y sangre entera se preparó a 5000 ng / ml mediante la adición de 5 µl de la solución de Trabajo de 1 mg / ml a 995 ul de plasma de rata o de sangre entera.

Muestras de homogeneizado de pulmón se prepararon mediante la dilución del homogeneizado de pulmón a 1 mg / ml de concentración de proteína con un tampón fosfato de salino (PBS), seguido de la adición de solución de 5 uL a la solución de Trabajo a 995 uL de homogeneizado de pulmón diluido.

Las muestras se incubaron a 37 º C con una agitación suave (65 ~ 75 rpm) en un incubador de baño de agua. En los tiempos 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 y 240 min, 25 uL alícuotas de muestras de incubación se transfirieron a placas de 96 pocillos e inmediatamente se precipitó proteína usando 150 uL de solución de extracción. Después de la terminación del experimento de incubación, la placa de la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 º C durante 10 minutos. Posteriormente, se utilizó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y agregar 50 µl de agua para todas las muestras. La placa se agitó en un vórtex antes del análisis LC-MS.

Muestra del procedimiento de preparación (Conjugados):

El artículo de prueba se preparó a 50.000 ng / ml mediante la adición de 5 ul de la solución de Trabajo de 1 mg / ml a 495 µl del plasma de rata. Las muestras se incubaron a 37º C con agitación suave (65 ~ 75 rpm) en un incubador de baño de agua. A las 0hr, 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 y 24 horas, 50 µL de alícuotas de muestras de incubación se transfirieron a la placa de 96 pozos y se agregaron 100 uL 40 mM TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) a cada muestra. La mezcla de reacción se incubó a 37 º C durante 1 hora. Después de la terminación de la reacción, la precipitación de proteínas se realizó utilizando 300uL de acetonitrilo. La placa de la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 º C durante 10 minutos. Posteriormente, se utilizó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir 125 uL de sobrenadantes a otra placa y agregar 50 µl de agua a todas las muestras. La placa se agitó en un vórtex antes del análisis LC-MS.

Muestras del análisis LC-MS de estabilidad

HPLC: Agilent 1290 HPLC con automuestreador

Columna: MAC-MOD ACE C18, 3 µm, 30mm x 2.1mm i.d.

Mobile phase A: Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

Fase móvil B: Ácido fórmico al 0,1% 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: Análisis completo con rango de masas de 100-1000 m / z

Adquisición y análisis de datos de software: MassHunter

Análisis de Datos:

Ensayo de estabilidad: Estabilidad de la vida media, (t ½), se determinaron los valores mediante la conversión de áreas de los picos en cada punto de tiempo porcentaje relativo permanente al área del pico inicial (t = 0).

Porcentaje restante = 100 x (área del pico de la muestra) ÷ (t = 0 área del pico)

El logaritmo natural de los valores de porcentaje restantes se calcularon y se representaron gráficamente versus el tiempo de la muestra (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó por regresión lineal (Microsoft Excel).

La estabilidad de la vida media se calculó por la fórmula, t ½ = 0,693 ÷ k

Ensayo de estabilidad del plasma basado en la actividad sustituta:

El protocolo de flujo de calcio descrito anteriormente fue seguido, con los siguientes cambios. Los péptidos también se incubaron con plasma de rata al 5% (Bioreclamation # RATPLNAHP-M, tratada con heparina Na). Las lecturas se tomaron en puntos de tiempo de

t_0 y t_{24} horas, después de la incubación en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 ° C. Se estimo la vida media plasmática peptidica en minutos mediante el cálculo de lo siguiente:

1) LN((EC_{50} at t_0)/ (EC_{50} at $t_{24\ hrs}$)),

2) Calcular la pendiente del valor anterior y

3) $t_{1/2}$ = 0.693/(pendiente^2).

Usando el ensayo de prueba (como se describió anteriormente), los polipéptidos de la invención mostraron eficacia yestabilidad de acuerdo a las Tablas 2 y 3, proporcionadas a continuación.

TABLA 2 Actividad y Estabiliad de los Polipéptidos

Péptido	**hAPJ Ca^{2+} Flux EC_{50} [nM]**	**Estabilidad del plasma basado en la actividad sustituta: t½ [min]**
Ejemplo 1	9.4	8
Ejemplo 2	3.2	39
Ejemplo 3	64.5	N.D.
Ejemplo 4	74.6	506
Ejemplo 5	1.6	5.0
Ejemplo 6	21.4	5
Ejemplo 7	11.8	9
Ejemplo 8	13.1	662.5
Ejemplo 9	23.4	109.2
Ejemplo 10	46.9	57.4
Ejemplo 11	32.2	32.8
Ejemplo 12	21.4	10
Ejemplo 13	12.2	10
Ejemplo 14	48.7	7.5

Ejemplo 15	193.5	17.7
Ejemplo 16	14.1	7
Ejemplo 17	410.3	11.4
Ejemplo 18	174	50
Ejemplo 19	79.3	50
Ejemplo 20	1.0	11.9
Ejemplo 21	2.9	>1000
Ejemplo 22	3.3	>1000
Ejemplo 23	72.2	3157
Ejemplo 24	85.8	1699
Ejemplo 25	227	>1000
Ejemplo 26	2292	52
Ejemplo 27	86.5	82
Ejemplo 28	3.1	13
Ejemplo 29	4.2	705.0
Ejemplo 30	0.4	660.7
Ejemplo 31	0.5	43.1
Ejemplo 32	3.0	>1000
Ejemplo 33	1.9	>1000
Ejemplo 34	0.6	>1000
Ejemplo 35	2.0	155.0
Ejemplo 35	66.7	8
Ejemplo 36	4.2	34
Ejemplo 37	937	47
Ejemplo 38	175	41
Ejemplo 40	2479	>1000
Ejemplo 41	839	>1000
Ejemplo 42	16.3	>1000
Ejemplo 43	28.9	>1000
Ejemplo	1.8	5.0

Comparativo: Pyr1-apelina-13		

TABLA 3 Correlación entre el Ensayo de Estabilidad Plasmática y el Ensayo de Estabilidad Plasmática Basado en Actividad Suplente

Péptido	**Estabilidad plasmática t½ [min]**	**Estabilidad plasmática basada en actividad suplente t½ [min]**
Pyr-1-Apelina 13	6.6	5.0
Ex 32	377	>1000

El polipéptido de la presente invención o bioconjugados del mismo puede tener una potencia del receptor APJ similar a apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización el polipéptido de la presente invención o bioconjugado del mismo tiene un EC_{50} menor que 100nM. En otra realización el polipéptido de la invención, o bioconjugado del mismo, tiene un EC_{50} menor que 50nM, preferiblemente menor que 25nM y más preferiblemente menor que 15nM. En aún otra realización, el polipéptido de la presente invención o bioconjugado tiene un EC_{50} menor que 10nM.

El polipéptido de la presente invención, o bioconjugado del mismo, puede tener una estabilidad plasmática superior a apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización, la mejoría en estabilidad plasmática es al menos de dos veces. En una realización, el polipéptido de la invención, o un bioconjugado del mismo, tiene una estabilidad plasmática de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención, o un bioconjugado de los mismos, tiene una estabilidad plasmática de al menos 60 minutos, o al menos 80 minutos, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

El polipéptido de la presente invención, o un bioconjugado del mismo, puede administrarse bien sea simultáneamente con, o antes de o después de, uno o más agentes terapéuticos. El polipeptido o bioconjugado de la presente invención pueden administrarse de manera separada, mediante la misma o diferente ruta de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica como los otros agentes.

En una realización, el invento proporciona un producto que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster de una sal del mismo, o un biconjugado del mismo y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultaneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición sensible a la activación del receptor APJ.

Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, y el otro agente terapéutico juntos en la misma composición farmacéutica, o un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, y el otro agente terapéutico en forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo y otro agente terapéutico. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describió anteriormente.

En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo. En una realización, el kit comprende medios para retener de manera separada dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida, o empaque dividido en aluminio. Un ejemplo de tal kit es paquete blister, como el que típicamente se utiliza para empacar tabletas, cápsulas y similares.

El kit del invento puede utilizarse para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las diferentes composiciones entre sí. Para ayudar en

el cumplimiento terapéutico, el kit del invento típicamente comprende pautas para administración.

En las terapias de combinación del invento, el péptido o bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico puede fabricarse y/o formularse por los mismos o diferentes fabricantes. Además, el péptido o bioconjugado del invento y el otro agente terapéutico serán llevados juntos en una terapia de combinación: (i) antes de entregar el producto de combinación a los médicos (*ej.* en el caso de un kit que comprende el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la pauta del médico) poco antes de administración; (iii) en los pacientes mismos, *ej.* durante la administración secuencial del polipéptido o bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico.

Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el medicamento se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor de apelina, en donde el medicamento se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un bioconjugado del mismo, para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o bioconjugado del mismo, se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor de apelina, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo. La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un

éster o una sal del mismo, o bioconjugado del mismo, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

La invención también proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente ha sido previamente tratado (ej, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente se ha tratado anteriormente (ej., dentro de las 24 horas) con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-CO-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de la aldosterona, bloqueadores de receptores de la endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y un inhibidor de NEP.

El término “en combinación con” un segundo agente o tratamiento incluye co-administración del polipéptido o bioconjugado de la invención (*ej.*, un polipéptido según cualquiera de las fórmulas I-IV o un polipéptido de otra manera descrito en la presente) con el segundo agente o tratamiento, la administración del compuesto de la invención primero, seguido por el segundo agente o tratamiento y administración del segundo agente o tratamiento primero, seguido por el compuesto de la invención.

El término “segundo agente” incluye cualquier agente que se conoce en la técnica para tratar, prevenir o reducir los síntomas de una enfermedad o trastorno descrito en la presente, *ej.* .un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, tal como por ejemplo, insuficiencia cardiaca aguda descompensada(ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular,

aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquemicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

Ejemplos de segundos agentes incluyen inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-CO-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de la aldosterona, bloqueadores de receptores de la endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y/o un inhibidor de NEP.

Inotropos como se utilizan en la presente incluyen por ejemplo dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendan, epinefrina, norepinefrine, isoproterenol y digoxin.

Los bloqueadores de 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, Danaparoida, Enoxaparina, Heparina, Tinzaparina, Warfarina.

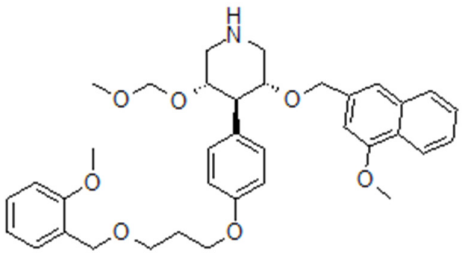
El término “inhibidores de la HMG-Co-A reductasa” (también llamado inhibidores de la beta-hidroxi-beta-metilglutaril-co-enzima-A reductasa) incluye agentes activos que pueden utilizarse para reducir los niveles de lípidos incluyendo el colésterol en la sangre. Ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina, rivastatina, simvastatina, y velostatina, o, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “inhibidor de la ACE” (también llamado inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina) incluye moléculas que interrumpen la degradación enzimática de angiotensina I a angiotensina II. Tales compuestos pueden utilizarse para la regulación de la presión sanguinea y para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril,

enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, y trandolapril, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

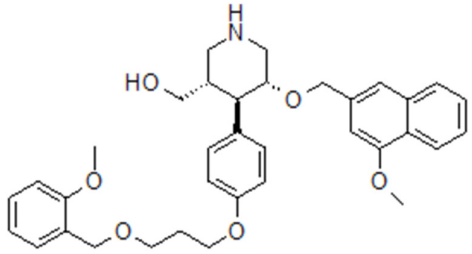
El termino "antagonista de endotelina" incluye bosentan (cf. EP 526708 A), tezosentan (cf. WO 96/19459), o, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "inhibidor de renina" incluya ditequiren (nombre químico: [1*S*-[1*R**,2*R**,4*R**(1*R**,2*R**)]]-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-L-prolil-L-fenilalanil-N-[2-hidroxi-5-metil-1-(2-metilpropil)-4-[[[2-metil-1-[[(2-piridinilmetil)amino]carbonil]butil]amino]carbonil]hexil]-*N*-alfa-metil-L-histidinamida); terlakiren (nombre químico: [*R*-(*R**,*S**)]-N-(4-morfolinilcarbonil)-L-fenilalanil-N-[1-(ciclohexilmetil)-2-hidroxi-3-(1-metiletoxi)-3-oxopropil]-S-metil-L-cisteineamida); Aliskiren (nombre químico: (2*S*,4*S*,5*S*,7*S*)-5-amino-*N*-(2-carbamoil-2,2-dimetiletil)-4-hidroxi-7-{[4-metoxi-3-(3-metoxipropoxi)fenil]metil}-8-metil-2-(propan-2-il)nonanamida) y zankiren (nombre químico: [1*S*-[1*R**[*R**(*R**)],2*S**,3*R**]]-*N*-[1-(ciclohexilmetil)-2,3-dihidroxi-5-metilhexil]-alfa-[[2-[[(4-metil-1-piperazinil)sulfonil]metil]-1-oxo-3-fenilpropil]-amino]-4-tiazolpropanamida), o sales de hidrocloruro del mismo, o, SPP630, SPP635 y SPP800 como se desarrolló por Speedel, o RO 66-1132 y RO 66-1168 of la Fórmula (A) y (B):



(A)

y



(B)

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

El término "alisquiren", si no está definido específicamente, se entiende tanto como la base libre y como una sal del mismo, especialmente una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferiblemente una sal de hemi-fumarato del mismo.

El término "bloqueador de canales de calcio (CCB)" incluye dihidropiridinas (DHPs) y no DHPs (ej., CCBs tipo diltiazem y tipo verapamil). Ejemplos incluyen amlodipina, Bepridil, Diltiazem, felodipina, riosidina, isradipina, lacidipina, nicardipina, nifedipina,

niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, Verapamil y nivaldipina, y preferiblemente es un no-DHP representativo seleccionado a partir del grupo que consta de flunarizina, prenilamina, diltiazem, fendilina, galopamil, mibefradil, anipamil, tiapamil y verapamil, o, sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

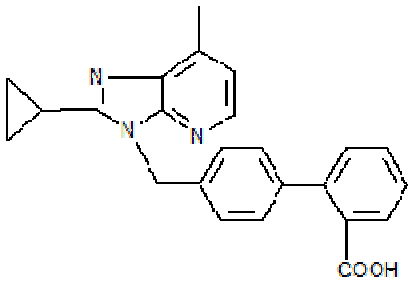
Los CCBs pueden utilizarse como fármacos anti-angina hipertensivos, anti-angina de pecho, o fármacos anti-arrítmicos.

El término "diurético" incluye derivados tiazídicos (por ejemplo, clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida y clorotalidon).

El término “Mimético de ApoA-I” inclye péptidos D4F (*ej.*, fórmula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F) (SEQ ID NO: 18).

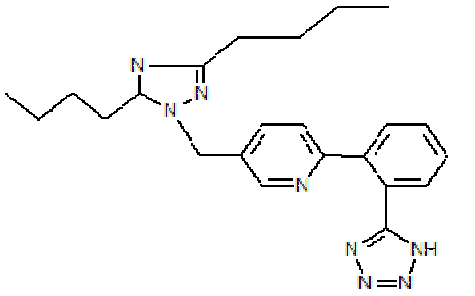
Un antagonista del receptor de antiotensina II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se entiende es un ingrediente activo que se fija al subtipo del receptor AT1 del receptor de angiotensina II pero no resulta en activación del receptor. Como una consecuencia de la inhibición del receptor AT_1, estos antagonistas pueden, por ejemplo ser empleados como antihipertensivos o para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva.

La clase de antagonistas de receptores AT_1 comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales, esencialmente se prefieren aquellos no peptídicos. Por ejemplo, se pueden mencionar los compuestos que son seleccionados a partir del grupo que consta de valsartan, losartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, saprisartan, tasosartan, telmisartan, el compuesto con la designación E-1477 de la siguiente fórmula

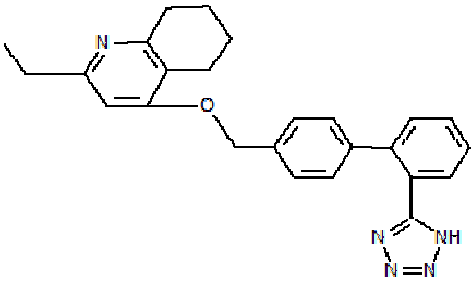


,

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



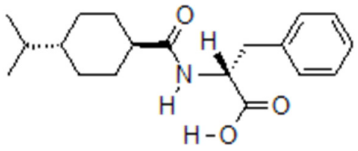
y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula



o, en cada caso, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los antagonistas preferidos de receptores AT_1 son candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan, valsartan. También se prefieren aquellos agentes que se han comercializado, el más preferido es valsartan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "agente anti-diabético" incluye mejoradores de secreción de insulina que promueven la secreción de insulina desde células β pancreáticas. Ejemplos incluyen derivados de biguanida (*ej.*, metformina), sulfonilureas (SU) (*ej.*, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-chloro-*N*-[(1-pirolidinilamino)carbonil]-bencensulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepid, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida, y tolilciclamida), o sales farmacéuticamente acetables de los mismos. Ejemplos adicionales incluyen derivados de fenilalanina (*ej.*, nateglinida [*N*-(*trans*-4-isopropilciclohexilcarbonil)-*D*-fenilalanina] (cf. 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-oxoetil}benzoico] (cf. EP 589874, EP 147850 A2, en particular Ejemplo 11 en pagina 61, y EP 207331 A1); dihidrato propionato (2*S*)-2-bencil-3-(*cis*-hexahidro-2-isoindolilcarbonil)- de calcio (*ej.*, mitiglinida (cf. EP 507534)); y glimepirida (cf. EP 31058).

Ejemplos adicionales de segundos agentes con los que el péptido y polipéptido de la invención pueden utilizarse en combinación incluyen inhibidores de DPP-IV, GLP-1 y agonistas de GLP-1.

DPP-IV es responsable de inactivar GLP-1. Más particularmente, DPP-IV genera un antagonista del receptor GLP-1 y por lo tanto acorta la respuesta fisiológica a GLP-1. GLP-1 es un estimulador principal de secreción de insulina pancreatica y tiene efectos benéficos directos en la eliminación de la glucosa.

El inhibidor de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) puede ser peptídico o, preferiblemente, no-peptídico. Los inhibidores de DPP-IV son en cada caso genericamente y específicamente divulgados *ej.,* en WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, 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 trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan en la presente solicitud como referencia a estas publicaciones. Se prefieren aquellos compuestos que se divulgan específicamente en el Ejemplo 3 de WO 98/19998 y Ejemplo 1 de WO 00/34241, respectivamente.

GLP-1 (péptido 1 tipo glucagón) es una proteína insulinotropica la cual es descrita, *ej.*, por W.E. Schmidt et al. en *Diabetologia*, 28, 1985, 704-707 y en US 5,705,483.

El término “agonistas de GLP-1” incluye variantes y análogos de GLP-1(7-36)NH_2 los cuales se divulgan en particular en US 5,120,712, US 5,118666, US 5,512,549, WO 91/11457 y por C. Orskov en J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826. Ejemplos adicionales incluyen GLP-1(7-37), en los cuales el compuesto, la funcionalidad de amida carboxi-terminal de Arg^{36} se desplaza con Gly en la posición 37 de la molécula GLP-1(7-36)NH_2 y variantes y análgos de las mismas incluyendo GLN^9-GLP-1(7-37), D-GLN^9-GLP-1(7-37), acetil 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. Se otorga preferencia especial al análogo del agonista de GLP exendina-4, descrito por Greig en Diabetologia 1999, 42, 45-50.

También incluidos en la definición "agente anti-diabético" están los potenciadores de sensibilidad a la insulina los cuales restauran la función deteriorada del receptor de insulina para reducir la resistencia a la insulina y consecuentemente aumentan la sensibilidad a la insulina. Ejemplos incluyen derivados de la tiazolidinodiona hipoglicémica (*ej.*, glitazona, (*S*)-((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2*H*-1-benzopiran-6-il)metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-{[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxopropil)-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-naftilsulfonil)-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-hidroxietoxi]bencil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-[4-(1-fenil-1-ciclopropanocarbonilamino)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-dihidroindol-1-il)etoxi)fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil])-2-propinil]-5-fenilsulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-clorofenil])-2-propinil]-5-(4-fluorofenil-sulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-{[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)fenil]metil}-tazolidina-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-2*H*-1-benzopiran-2-il)metoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-[6-(2-fluoro-benciloxi)naftalen-2-ilmetil]-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-{[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil}tiazolidina-2,4-diona (T-174) y 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-(4-trifluorometil-bencil)benzamida (KRP297)).

Agentes anti-diabéticos adicionales incluyen, moduladores de la vía de señalización de insulina, inhibidores similares de las proteina tirosina fosfatasas (PTPases), compuestos miméticos antidiabéticos de moléculas no pequeñas e inhibidores de la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT); compuestos que influyen en la produccíón de glucosa hepática no regulada, inhibidores similares de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-Bpasa), inhibidores de la glicogen fosforilasa (GP), antagonistas del receptor de glucagón e inhibidores de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

(PEPCK); inhibidores de la piruvato deshidrogenasa (PDHK); inhibidores del vaciado gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de proteínas no acopladoras (UCPs); agonistas PPAR tipo no-glitazona; agonistas duales PPARα/ PPARγ; compuestos que contienen vanadio antidiabético; hormones de incretina, péptido 1 tipo glucagón (GLP-1) y agonistas de GLP-1; antagonistas de receptores de imidazolina de células beta; miglitol; antagonistas α_2-adrenérgicos; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados a partir de bloqueadores de receptores β-adrenérgicos tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas del receptor de angiotensina II tales como bloqueadores AT1; agentes antidiabéticos tales como inhibidores DPPIV (ej. vildagliptina) y agonista del péptido GLP1.

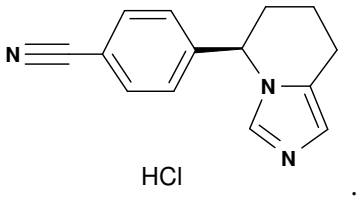
El término “agente reductor de la obesidad” incluye inhibidores de la lipasa (ej., orlistat) y supresores del apetito (ej., sibutramina y fentermina).

Un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se entiende que es un ingrediente activo que tiene la propiedad de inhibir la producción de aldosterona. La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una ezima mitrocondrial del citocromo P450 que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, es decir la conversión de 11-desoxicorticosterona en aldosterona**.** La inhibición de la producción de aldosterona con los conocidos inhibidores de la aldosterona sintasa se conoce como una variante exitosa al tratamiento de hipocalemia, hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva, fibrilación auricular o insuficiencia renal. Tal actividad de inhibición de la aldosterona sintasa se determina facílmente por los expertos en la técnica según ensayos estándar (*ej.*, EE.UU. 2007/0049616).

La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende inhibidores de la aldosterona sintasa tanto ésteroideos como no ésteroideos, los últimos siendo los más preferidos.

Se otorga preferencia a inhibidores de la aldosterona sintasa comercialmente disponibles o a aquellos inhibidores de la aldosterona sintasa que han sido aprobados por las autoridades de la salud.

La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende compuestos que tiene diferentes características estructurales. Un ejemplo de inhibidor no ésteroideo de la aldosterona sintasa es el enantiomero (+) del hidrocloruro de fadrozol (patentes EE.UU. 4617307 y 4889861) de la fórmula



.

O, si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos genericamente y específicamente divulgados ej., en US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan en la presente solicitud como referencia a esta publicación. Inhibidores de la aldosterona sintasa preferidos adecuados para el uso en la presente invención incluyen, si limitación 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-metilbenzonitrilo; (4-metoxibencil)metilamida del ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxilico; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo; éster butilo del ácido 5-(4-Ciano-2-metoxifenil)-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-metoxibenzonitrilo; áster 4-fluorobencilo del ácido 5-(2-Cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; éster metilo del ácido 5-(4-Ciano-2-trifluorometoxifenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; éster 2-isopropoxietilo del ácido 5-(4-Ciano-2-metoxifenil)-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-metilbenzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo; 4-(6,7-Dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-2-metoxibenzonitrilo; 3-Fluoro-4-(7-metileno-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 enatiómero (R) o (S) de los mismos; o si apropiadamente, una sal farmaceuticamente aceptable de los mismos.

El término inhibidores de la aldosterona sintasa también incluye compuestos y análogos divulgados en WO2008/076860, WO2008/076336, WO2008/076862, WO2008/027284, WO2004/046145, WO2004/014914, WO2001/076574.

Además inhibidores de la aldosterona sintasa también incluyen compuestos y análogos descritos en las solicitudes de patentes EE.UU. US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 y en las solicitudes PCT WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 y en la solicitud de patente europea EP 1886695. Inhibidores de la aldosterona sintasa preferidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación 8-(4-Fluorofenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c1[1 ,41oxazina; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2-fluorobenzonitrilo; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2,6-difluorobenzonitrilo; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2-metoxibenzonitrilo; 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-Cianofenil)-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)naftaleno-1-carbonitrilo; 8-[4-(1*H*-Tetrazol-5-il)fenil1-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazina como se desarrollan por Speedel o en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si apropiable, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos genérica y específicamente divulgados en, por ejemplo, el documento WO 2009/156462 y WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones. Inhibidores preferidos de la aldosterona sintasa adecuados para la combinación en la presente invención incluyen, clorhidrato de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol-1-ilmetil)-benzonitrilo, 1-(4-Metanosulfonil-bencil)-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol, 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1H-indol, éster

etílico 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-ilmetil]-etanosulfonamida, éster 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilo del ácido pirrolidina-1-sulfonico, *N*-Metil-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(2-pirrolidin-1-il-etilamino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-3-il]-1-metil-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-Cloro-1-metil-2-{5-[(1-metil-piperidin-4-ilamino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida del ácido Morfolina-4-carboxilico, *N*-[5-(6-Cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-etanosulfonamida, *C,C*,*C*-Trifluoro-N-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, N-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida, N-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metanosulfonamida, N-(5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)butano-1-sulfonamida, N-(1-(5-(4-ciano-3-metoxifenil)piridin-3-il)etil)etanosulfonamida, N-((5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)(ciclopropil)metil)etanosulfonamida, N-(ciclopropil(5-(1*H*-indol-5-il)piridin-3-il)metil)etanosulfonamida, N-(ciclopropil(5-naftalen-1-il-piridin-3-il)metil)etanosulfonamida, [5-(6-cloro-1-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida del ácido etanosulfonico y {[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil}-etil-amida del ácido etanosulfonico.

El término “bloqueador del receptor de entotelina” 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 éster de colésterilo de varios ésteres de colésterilo y triglicéridos a partir de HDL a LDL y VLDL. Tal actividad de inhibición de CEPT se determina facílmente por los expertos en la técnica según ensayos estándar (*ej.*, Patente EE.UU. 6.140.343). Ejemplos incluyen compuestos divulgados en la Pat. EE.UU. No. 6,140,343 y Patente EE.UU.No. 6,197,786 (*ej.*, éster etilo del ácido [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluorometil-bencil)-metoxicarbonil-amino]-2-etil-6-trifluorometil-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-carboxílico (torcetrapib); compuestos divulgados en la Patente EE.UU. No. 6,723,752 (*ej.*, (2R)-3-{[3-(4-cloro-3-etil-fenoxi)-fenil]-[[3-(1,1,2,2- tetrafluoro-etoxi)-fenil]-metil]-amino}-1,1,1-trifluoro-2-propanol); compuestos divulgados en la solicitud de patente EE.UU. Ser. No. 10/807,838; derivados de polipéptidos divulgados en la Patente EE.UU. No. 5,512,548; derivados de rosenonolactona y análogos que contienen fosfato de colésteril éster divulgado en *J. Antibiot.,* 49(8): 815- 816 (1996), y *Bioorg. Med. Chem. Lett.;* 6:1951-1954 (1996),

respectivamente. Además, los inhibidores de CETP también incluyen aquellos divulgados en WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, 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 neutral (NEP) EC 3.4.24.11. Ejemplos incluyen Candoxatril, Candoxatrilat, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Sampatrilat, Fasidotril, Omapatrilat, Gemopatrilat, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 y éster etilo del ácido (2R,4S)-5-Bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionilamino)-2-metil-pentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Inhibidores de NEP también incluyen derivados de dipéptido fosfono/biarilo sustituidos, como los divulgados en el Número de Patente EE.UU. 5,155,100. Los inhibidores NEP también incluyen el derivado de N-mercaptoacil-fenilalanina como se divulgó en la solicitud PCT Número WO 2003/104200.

Los inhibidores de NEP también incluyen agentes anti-hipertensivos de acción dual como se divulga en las solucitudes PCT No. WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen compuestos divulgados en solicitud EE.UU. No. 12/788,794; 12/788,766 y 12/947,029. Los inhibidores de NEP también incluyen los compuestos divulgados en WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 y solicitudes EE.UU. provisionales No 61/414171 y 61/414163.

En una realización, la invención proporciona un método de activar el receptor APJ, en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

En una realización, la invención proporciona un método de tratar un trastorno o una enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

En una realización, la invención proporciona un método de tratar un trastorno o una enfermedad sensible a la activación (agonismo) del receptor APJ, en un sujeto, en donde el trastorno o la enfermedad se selecciona a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis,

enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

En una realización, la invención proporciona un compuesto según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o un biocojugado del mismo, para uso como un medicamento.

En una realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ. En otra realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en donde dicho trastorno o enfermedad se selecciona en particular a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

Ejemplificación de la invención: Síntesis de péptidos y polipéptidoS

Abreviatura	**Definición**
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	ácido acético
Ac_2O	anhídrido acético
ε-Ahx	Ácido ε-Amino hexanoico
AM	Aminometil
BAL	Enlazador de amida de esqueleto
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Boc	*tert*-Butiloxicarbonil
Bzl	Bencilo
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N, *N*'-diisopropiletilamina
DMA	*N,N*'-Dimetilacetamida
DMF	*N,N'*-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DVB	Divinilbenceno
EDT	Etanoditiol
FA	Ácido Fórmico
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBSS	Solución salina amortiguada de Hank
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetilanosulfónico

HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HSA	Albúmina sérica humana
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
HRMS	Espectrometría de masa de alta resolución
ivDde	(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
LN	Logarithmus naturali (logaritmo natural)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masa
Nal	2-Naftilalanina
Nle	Norleucina
NMP	N-Metilpirrolidina
Oxima Pura	2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil
*p*E	Piroglutamato
PG	Grupo protector
PBS	Solución salina amortiguada por fosfato
Ph	Fenil
PhP	Fenilprolina
Pip	Ácido pipecólico
Pol	Soporte polimérico
PS	Poliestireno
rt	temperatura ambiente
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SPPS	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida
TBME	terc-butilmetiléter
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
tBuOH	*terc*-butanol
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

TIS, TIPS	triisopropilsilano
t_R	tiempo de retención
Trt	Tritilo
UPLC:	Cromatografía líquida de ultra desempeño
UV	Ultravioleta

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

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

- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 μm, 30x100 mm, Part No. 186002572 (una columna o dos columnas en serie)
- Columna Waters Atlantis Prep OBD T3, 5 μm, 30x150 mm, Parte No.186003703
- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 μm, 30x50 mm, Part No. 186002572

Las fases moviles constaron de eluyente A (0.1% TFA en H_2O) y eluyente B (ACN). Los gradientes se diseñaron con base en los requerimientos específicos del problema de 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 nm y UPLC-MS usando ionización por electroatomización.

Los péptidos mostrados en la Tabla 4 se sintetizaron utilizando los procedimientos generales descritos a continuación Los extremos N o C no sustituidos se indican por *H* o *OH* itálicas, respectivamente.

Tabla 4

Ejemplo	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
Ejemplo 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	19
Ejemplo 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*	20
Ejemplo 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*	21
Ejemplo 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2	22
Ejemplo 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*	23
Ejemplo 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	24
Ejemplo 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	25
Ejemplo 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*	26
Ejemplo 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)*	27
Ejemplo 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*	28
Ejemplo 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*	29
Ejemplo 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	30
Ejemplo 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	31
Ejemplo 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	32
Ejemplo 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	33
Ejemplo 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	34
Ejemplo 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	35
Ejemplo 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*	36
Ejemplo 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	37
Ejemplo 20	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	38
Ejemplo 21	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	39
Ejemplo 22	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	40
Ejemplo 23	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	41
Ejemplo 24	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	42
Ejemplo 25	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH_2*	43

Ejemplo 26	*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*	44
Ejemplo 27	*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*	45
Ejemplo 28	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	46
Ejemplo 29	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*	47
Ejemplo 30	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*	48
Ejemplo 31	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*	49
Ejemplo 32	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetilo)*	50
Ejemplo 33	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	51
Ejemplo 34	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*	52
Ejemplo 35	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	53
Ejemplo 35	*H*-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*	54
Ejemplo 36	*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*	55
Ejemplo 37	*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*	56
Ejemplo 38	*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*	57

en el que los dos aminoácidos marcados con "*" representan los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o amida a través de su cadena lateral.

Métodos Analíticos

1a) HPLC-Método Analítico A

- Columna: Waters Xbridge™ C18 (50x4.0 mm), 3.5 µm; Parte n°: 186003031
- Eluyente A: TFA al 0,07% en agua / Eluyente B: TFA al 0,1% en ACN
- Flujo: 1,5 ml/min
- Temperatura: 40 ° C
- Gradiente:

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

12,2	95	5

1b) HPLC-Método Analítico A

- Columna: Xbridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 µm; Parte n°: 186003612
- Eluyente A: TFA al 0,1% en agua / Eluyente B: TFA al 0,1% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 40 ° C
- Gradiente:

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

2a) UPLC-MS-Método Analítico C

- Columna: Acquity UPLC® BEH300 C18 (50x2.1 mm), 1,7 µm; Parte n°: 186003685
- Eluyente A: TFA al 0,05% en agua / Eluyente B: TFA al 0,04% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 80 ° C
- Gradiente:

Tiempo [min]:	A [%]	B [%]
0,0	100	0
0,2	100	0
4,4	2	98
4,8	2	98
4,9	100	0
5,0	100	0

2b) UPLC-HRMS-Método Analítico D

- Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7.um, 2.1x50mm, Parte n°: 186002350
- Eluyente A: FA al 0,05% + acetato de amonio 3,75 mM en agua, Eluyente B: FA al 0,04% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 ° C
- Gradiente: 2 a 98% en 4.4 min

3) Método Analítico E:

- Columna Xbridge C18, 3.5 µm, 3.0 x 30 mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: CAN
- Tasa de flujo: 2 mL/min
- Gradiente: 0 min 40% B; 40% a 95% B en 1.70 min, 2.0 min 95% B; 2.1 min 40% B
- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 150-1600
- HPLC: Agilent serie 1100
- Temperatura: 40C

3) Método Analítico F:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%)
- Tasa de flujo: 1 mL/min
- Gradiente: 0 min 2% B; 2% a 98% B en 1.7 min, 2.06min 98% B; 2.16min 2% B
- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperatura: 50C

3) Método Analítico G:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%)
- Tasa de flujo: 1 mL/min
- Gradiente: 0 min 40% B; 40% a 98% B en 1.40 min, 2.05 min 98% B; 2.1 min 40% B

- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperatura: 50C

Los datos analíticos para péptidos de los Ejemplos 1 a 38 se resemen en la Tabla 5 y se generó utilizando los métodos analíticos descritos anteriormente.

Tabla 5

	HPLC		**Espectrometría de masa**				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calculado)	**$[M+3H]^{3+}$** (calculado)
Ejemplo 1	3,48	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 2	3,66	A	735,4	490,6	C	735,4	490,6
Ejemplo 3	3,60	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 4	2,65	A	683,4	455,9	C	683,4	455,9
Ejemplo 5	3,95	A	782,4	521,9	C	782,4	521,9
Ejemplo 6	3,49	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 7	3,55	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 8	2,85	A	719,3	479,9	C	719,4	479,9
Ejemplo 9	3,75	A	742,4	495,3	C	742,4	495,3
Ejemplo	3,55	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3

10							
Ejemplo 11	3,57	A	686,9	458,3	C	686,9	458,2
Ejemplo 12	3,51	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 13	3,54	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 14	3,46	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 15	3,44	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 16	3,59	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 17	3,61	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 18	7,60	B	775,391	517,263	D	775,385	517,256
Ejemplo 19	7,40	B	751,392	501,263	D	751,385	501,256
Ejemplo 20	3,41	A	743,4	495,9	C	743,4	495,9
Ejemplo 21	7,35	B	730,355	487,239	D	730,361	487,241
Ejemplo 22	8,62	B	739,877	493,587	D	739,856	493,573
Ejemplo 23	7,32	B	737,374	491,918	D	737,377	491,921
Ejemplo 24	7,35	B	737,375	491,919	D	737,377	491,921
Ejemplo 25	5,63	B	620,822	414,217	D	620,825	414,219

Ejemplo 26	7,58	B	754,368	503,247	D	754,361	503,241
Ejemplo 27	7,36	B	737,374	491,918	D	737,369	491,913
Ejemplo 28	3,63	A	713,9	476,2	C	713,8	476,2
Ejemplo 29	3,78	A	720,9	480,9	C	720,9	480,9
Ejemplo 30	3,82	A	691,9	461,6	C	691,8	461,6
Ejemplo 31	3,74	A	643,3	429,2	C	643,3	429,2
Ejemplo 32	8,01	B	643,328	429,222	D	643,324	429,252
Ejemplo 33	7,73	B	700,832	467,557	D	700,845	467,566
Ejemplo 34	7,17	B	609,809	406,875	D	609,810	406,876
Ejemplo 35	8,99	B	710,351		D	710,332	473,890
Ejemplo 35	6,89	B	568,289	379,196	D	568,292	379,197
Ejemplo 36	7,69	B	724,843	483,564	D	724,837	483,558
Ejemplo 37	6,62	B	715,848	477,568	D	715,843	477,562
Ejemplo 38	8,28	B	728,873		D	728,869	

Procedimientos Sintéticos Generales

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq., 1,0-1,6 mmol / g) se lavó a fondo con DCM. El aminoácido deseado (típicamente 0,5-2 eq. relativo a la resina, considerando una carga de 1,6 mmol / g) se disolvió en DCM (aprox. 10 mL por gramo de resina) y DIPEA (4 eq. relativa a la resina, considerando una carga de 1,6 mmol / g). La solución se agregó a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3-16 h. La resina se drenó y luego se lavó a fondo secuencialmente con DCM / MeOH / DIPEA (17:02:01), DCM, DMA, DCM.

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

La carga de la resina se calcula según la fórmula:

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

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

2) Síntesis de péptidos en fase sólida

2a) Síntesis de Ciclo A en sintetizador Prelude$_{TM}$

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina / DMA (1:4) o 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), y DIPEA (4,5 eq.; solución a 0,9 M en NMP) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA la etapa de acoplamiento se repite típicamente 1 a 3 veces dependiendo de los requisitos específicos.

Después del lavado con DMA, se llevó a cabo el recubrimiento mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2a) Ciclo de Síntesis B en sintetizador Prelude™

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (3 eq.; solución a 0,2 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), y DIPEA (3,3 eq.; solución a 0,66 M en NMP) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA la etapa de acoplamiento se repite típicamente 1 a 3 veces dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMAm, se realizó capping mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2b) Ciclo de Síntesis C en sintetizador Prelude™

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina / DMA (1:4) o 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. Se realizó capping mediante adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2c) Ciclo de Síntesis D en sintetizador Liberty™

La resina se lavó con DMF y DMC. Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina / DMF al 20% (típicamente 7 ml por 0,1 mmol dos veces). La resina se lavó con DMF y DMC. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (5 eq.; solución a 0,2 M en NMP), HCTU (5 eq.; solución a 0,5 M en DMF), y DIPEA (10 eq.; solución a 2 M en DMF) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a 75 o 50 ° C durante típicamente 5 a 50 min con potencia microondas de 0 a 20 watts dependiendo de los

requisitos específicos. Después de lavar con DMF la etapa de acoplamiento se puede repetir una vez dependiendo de los requisitos específicos. La resina se lavó con DMF.

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

3a) Método de Escisión A

La resina (0,1 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h con TFA/EDT/TIS acuoso al 95% (95:2.5:2.5) (3 mL). La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió una solución fresca (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (10-20 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Este paso se realiza 1-2 veces. El sólido se secó en alto vacío.

3b) Método de Escisión B

La resina (0,1 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h con TFA/TIS/DTT acuoso al 95% (95:2.5:2.5) (3 mL). La solución de escisión se separó por filtración. La resina se lavó una vez con TFA acuoso al 95% (1 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (10 ml) al resid uo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se vertió, el proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó en alto vacío.

3c) Método de Escisión C

Se añadió HFIP / DCM (1:3) (3 ml) a la resina (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La solución de escisión se separó por filtración y se

recogió. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la resina se lavó una vez con HFIP / DCM (1:3) (1 ml). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. El producto crudo se liofilizaron a partir de ACN/H_2O.

4) Formación de disulfuro

4a) Método de Ciclización A

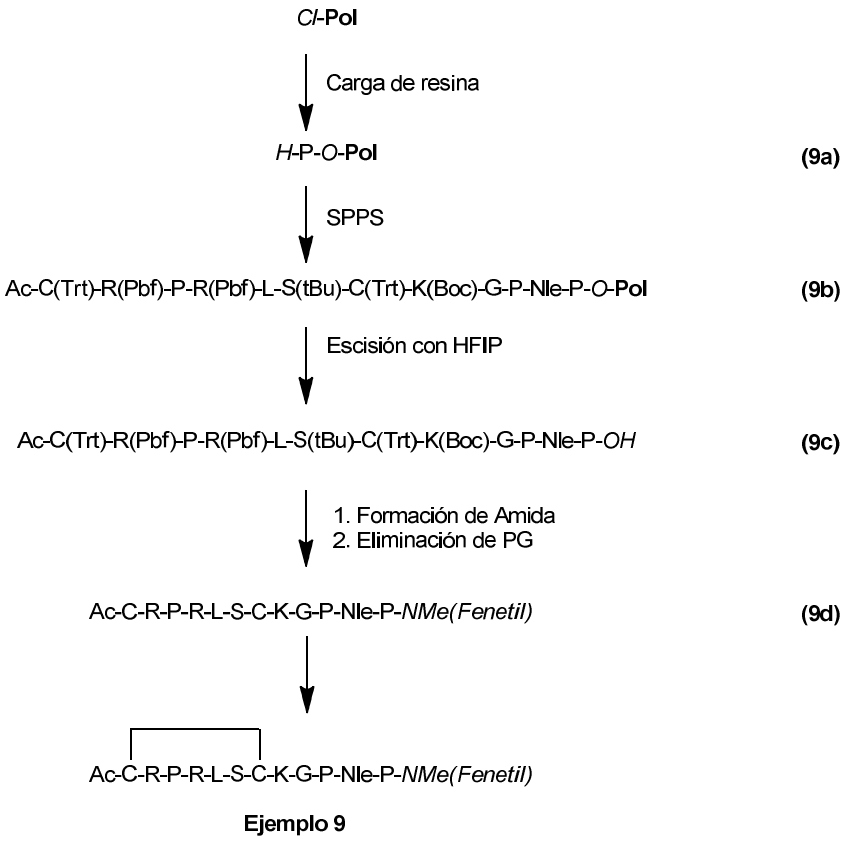
El péptido precursor lineal completamente desprotegido se disolvió en H_2O/DMSO (9:1) o (4:1) para proporcionar típicamente una concentración de 0,5-7 mM. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16-96 h típicamente, dependiendo de los requisitos y después se concentró a sequedad a alto vacío.

4b) Método de Ciclización B

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente) se disolvió en H_2O para proporcionar típicamente una concentración de 1-25 mM. Se añadió una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (1-2 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se logra la conversión completa. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O para apagar el exceso de I_2.

En el siguiente se describen las síntesis de ejemplos representativos.

Ejemplo 9 Síntesis de Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 27)



Ejemplo 9

(SEQ ID NOS 58, 58, 27 y 27 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 9ª**

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (2,00 g, 3,20 mmol) se lavó con DCM (3x). Se añadió una solución de Fmoc-P-OH (1,08 g, 3,20 mmoles) en DCM (20 ml) y DIPEA (2,24 ml, 12,8 mmol) y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La resina se lavó a fondo con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x).

A continuación, la resina se trató doce veces durante 2 min con una mezcla de piperidina / DMA (1:4) (12 ml cada vez). Las soluciones de piperidina / DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina (véase procedimiento general).

La resina se lavó a fondo con DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) y se secó a vacío para proporcionar el **Intermediario 9a** (2,25 g, carga = 1,12 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 9b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermediario 9a (89 mg, 0,10 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

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

- Preparación de **Intermediario 9c**

(Escisión de HFIP a partir de la resina)

Se añadió HFIP / DCM (1:3) (3 ml) al **Intermediario 9b** (0,100 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La solución de escisión se separó por filtración y se recogió. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la resina se lavó una vez con HFIP / DCM (1:3) (1 ml). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron

a sequedad al vacío. El producto crudo se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Intermediario 9c** (37,2 mg, 14,8 µmol) como un sólido blanco.

- Preparación de **Intermediario 9d**

(Formación de amida y eliminación del grupo protector)

Se disolvieron **Intermediario 9c** (37,0 mg, = 14,7 µmoles) y TBTU (7,1 mg, 22,1 µmol) en DCM (5 ml). DIPEA (5,1 µl, 29,4 µmol) se añadió y la solución se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. Se agregó N-metil-fenetilamina (3,2 µl, 22.1 µmol), la reacción se agitó durante 1 h 40 min a temperatura ambiente y después se repartió entre EtOAc / n-butanol (9:1) (50 ml) y NaHCO3 acuoso al 5%(5 ml). La capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso al 5% (5 ml), salmuera (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a sequedad a vacío.

El residuo se disolvió en metanol en TFA / TIS / EDT (95:2,5:2,5) (5 ml) acuoso al 95%. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente y después se vertió en heptano / éter frío (1:1) (35 ml). La suspensión se centrifugó y el solvente se decantó. El residuo se lavó dos veces con éter dietílico / heptano frío (1:1) (10 ml) y después se secó a vacío para proporcionar **Intermediario 9d** (27,0 mg, 14,7 µmoles) como un sólido de color beige. El producto se sometió al siguiente paso sin purificación.

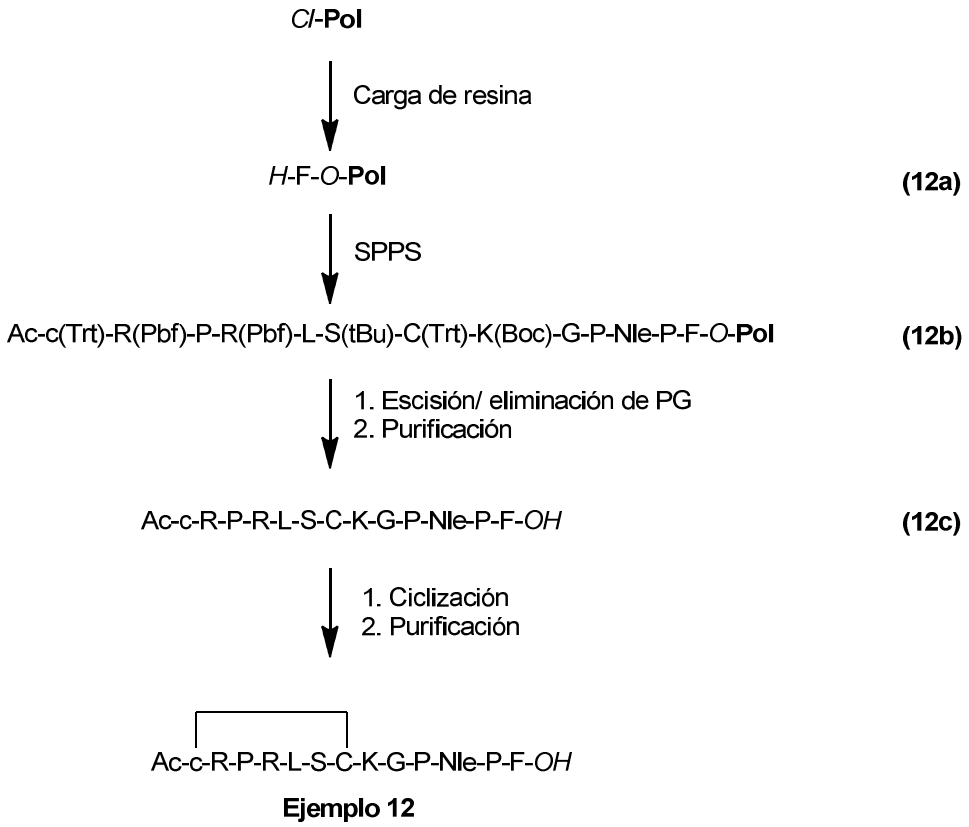
- Preparación del **Ejemplo 9**

(Formación de disulfuro y purificación)

Se disolvió **Intermediario 9d** (26,9 mg, 14,7 µmol) en H_2O (3,7 ml) (la solución era ligeramente turbia). Una solución de I_2 50 mM en AcOH (0,353 ml, 17,6µmol) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O (0.044 ml, 22,1µmol) para apagar el exceso de yodo. La solución se concentró a aproximadamente 3,5 ml y después se sometió a HPLC preparativa de fase inversa. Las fracciones se liofilizaron para proporcionar el **Ejemplo 9** (6,8 mg, 3,7 µmoles) como un sólido blanco.

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A; t_R = 3,75 min) y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$=495.3; calculado: $[M+3]^{3+}$=495.3).

Ejemplo 12 Síntesis de Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 30)



(SEQ ID NOS 59, 30 y 30 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 12ª**

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (10,0 g, 16,0 mmol) se lavó con DCM (3x). Se añadió una solución de Fmoc-F-OH (12,4 g, 32,0 mmoles) en DCM (100 ml) y DIPEA (11,2 ml, 64,0 mmol) y la suspensión se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. La resina se lavó a fondo con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x).

A continuación, la resina se trató doce veces durante 2 min con una mezcla de piperidina / DMA (1:4) (50 cada vez) seguido por lavado con DMA (2x). Las soluciones de piperidina / DMA y soluciones de lavado de DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina (véase procedimiento general).

La resina se lavó a fondo con DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) y se secó a vacío para proporcionar el **Intermediario 12a** (12,8 g, carga = 0,79 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 12b**

  (Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermediario 12a (127 mg, 0,10 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de Síntesis
1	P	2 x 1 h	A
2	Nle	2 x 1 h	A
3	P	2 x 1 h	A
4	G	2 x 2 h	A
5	K(Boc)	2 x 1 h	A
6	C(Trt)	1 x 3 h	A
7	S(tBu)	2 x 1 h	A
8	L	2 x 1 h	A
9	R(Pbf)	4 x 3 h	A
10	P	2 x 2 h	A
11	R(Pbf)	4 x 3 h	A
12	c(Trt)	1 x 3 h	A
13	Ac	1 x 20 min	C

- Preparación de **Intermediario 12c**

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

Intermediario 12b (0.10 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4x). Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se lavó de nuevo con heptano / dietil éter frío (1:1) (10 ml), la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó para proporcionar **el Intermediario 12c** (53 mg, 0,029 mmol).

- Preparación del **Ejemplo 12**

(Ciclización y purificación)

Intermediario 12c (53 mg, 0,029 mmoles) se disolvió en H_2O/DMSO (9:1) (18 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 hora luego se concentró hasta sequedad al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó para proporcionar el **Ejemplo 12** como un sólido blanco (27,4 mg, 0,014 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A; t_R = 3,51 min) y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$=505.3; calculado: $[M+3]^{3+}$=505.3).

Ejemplo 18 Síntesis de Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 36)

Síntesis de péptidos lineales sobre un soporte sólido:

Resina Fmoc-D-Phe-Wang (sustitución: 0,66 mmol / g) se sometió a síntesis de péptidos de fase sólida manual a través de química Fmoc estándar. resina a 0,3 mmol se hinchó en DMF durante 30 minutos; DMF se drenó y la resina se trató con piperidina al 20% en DMF durante 30 min para eliminar el grupo Fmoc. La resina se lavó con DMF 3 veces y se acopla con una solución de aminoácidos Fmoc pre-activadas (aminoácido Fmoc / HBTU / HOBt / NMM = 3:3:3:6 eq) durante 2 horas. Prueba de ninhidrina se realizó después de cada acoplamiento para comprobar la eficacia de acoplamiento.

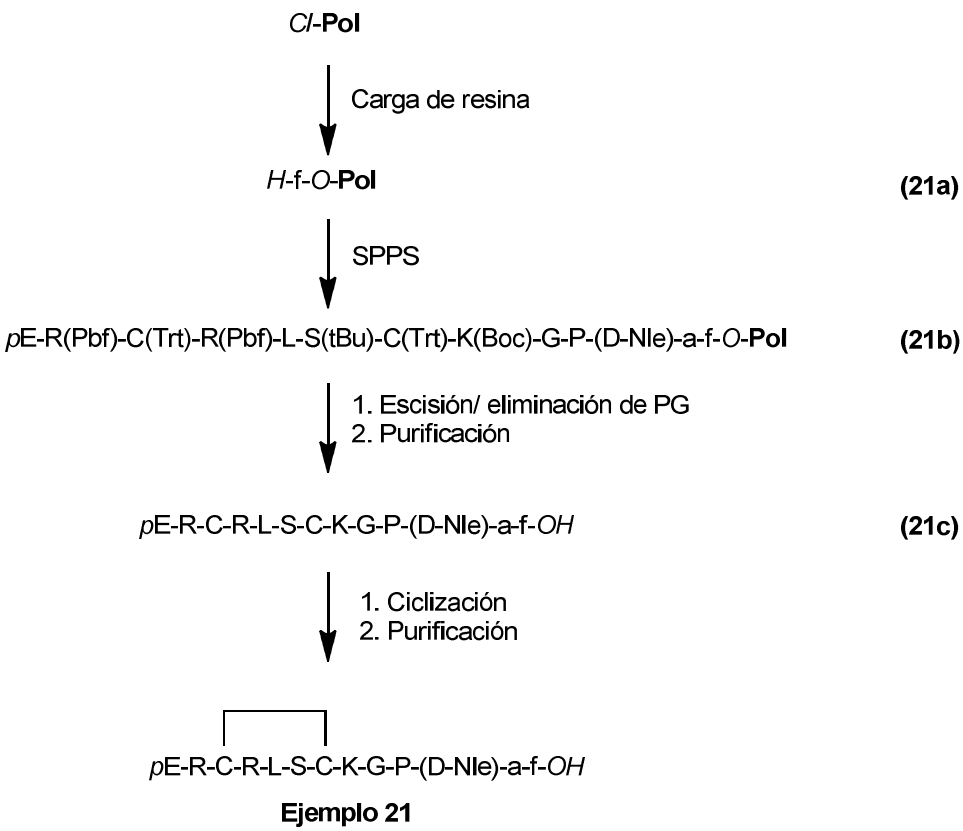
La cadena de péptido se ensambló a la resina mediante eliminación repetitiva del grupo protector Fmoc y acoplamiento del aminoácido protegido hasta extremo N-terminal. Después del acoplamiento del último aminoácido, resina peptídica se lavó con DMF y éter etílico, y se secó bajo vacío. La resina peptídica secada se trató con cóctel de escisión de TFA (TFA/tiolanisol/fenol/EDT/H_2O = 87.5:5:2.5:2.5:2.5, v / v) para la escisión y eliminación de los grupos protectores de cadena lateral. Los péptidos crudos se precipitaron en éter frío, se recogieron por filtración y se secaron a alto vacío. Los péptidos crudos se purificaron en HPLC (Columna: Delta Pak C18 de 2" pulgadas, Longitud de onda: 215 nm) para proporcionar el producto deseado.

Ciclización:

Cada uno de los péptidos crudos se disolvió en agua-acetonitrilo (reactivo A.C.S., Fisher) a una concentración de 1mg/ml (alrededor de 80%: 20%; Agua: Acetonitrilo, V:V), 0,1 M I_2 (reactivo A.C.S., Sigma Aldrich) en AcOH al 50% (reactivo A.C.S., Fisher) / H_2O se añadió por goteo a la solución con agitación vigorosa hasta que el color de I_2 persiste. Al terminar la oxidación (monitorizada por HPLC analítica y espectroscopia de masas), ácido L-ascórbico a 1 M (reactivo A.C.S., Sigma Aldrich) solución acuosa se añadió por goteo con agitación continua para reducir el exceso de I_2 hasta que la solución se vuelve incolora. Después de la filtración, la solución anterior se cargó sobre columna C18 de 2 pulgadas (detección a 215 nm), y se purificó mediante el uso de búfer de TFA (Búfer A, TFA al 0,1% (calidad A.C.S., NuGeneration Technology, LLC) en agua; Búfer B, acetonitrilo al 100%), fracciones recogidas con pureza de > 95% se liofilizaron para secar.

Example 21 Síntesis de *p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH* (C^3-C^7 disulfuro) (SEQ

ID NO: 39)



Ejemplo 21

(SEQ ID NOS 60, 39 y 39, respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 21ª**

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

Se hizo reaccionar resina de cloruro de 2-clorotritilo (5,0 g, 8,01 mmol) con una solución de Fmoc-f-OH (3,10 g, 8,01 mmoles) en DCM (50 mL) y DIPEA (5,59 mL, 32,0 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermediario 21a** (5,87 g, carga = 0,897 mmoles / g).

- Preparación de **Intermediario 21b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

Intermediario 21a (89 mg, 0,100 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia Microondas	Ciclo de Síntesis
1	a	1 x 7,5 min	50	20	D
2	D-Nle	1 x 7,5 min	50	20	D
3	P	1 x 7,5 min	50	20	D
4	G	1 x 7,5 min	50	20	D
5	K(Boc)	1 x 7,5 min	50	20	D
6	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
7	S	1 X 7.5 min	50	25	D
8	L	1 x 7,5 min	50	25	D
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
10	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7,5 min	50	25	
12	*p*E	1 x 7.5 min	50	25	D

- Preparación de **Intermediario 21c**

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

Una mezcla de TFA / EDT / TDT acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml) se añadió al **Intermediario 21b** (0,1 mmoles). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h,

después la solución de escisión se separó por filtración. La resina se trató luego de nuevo con TFA / EDT / TIS al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml), se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, y se filtró. Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / éter dietílico frío (1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (10 ml) al residuo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se vertió, el proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó en alto vacío El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Intermediario 21c** (55 mg, 0,030 mmol).

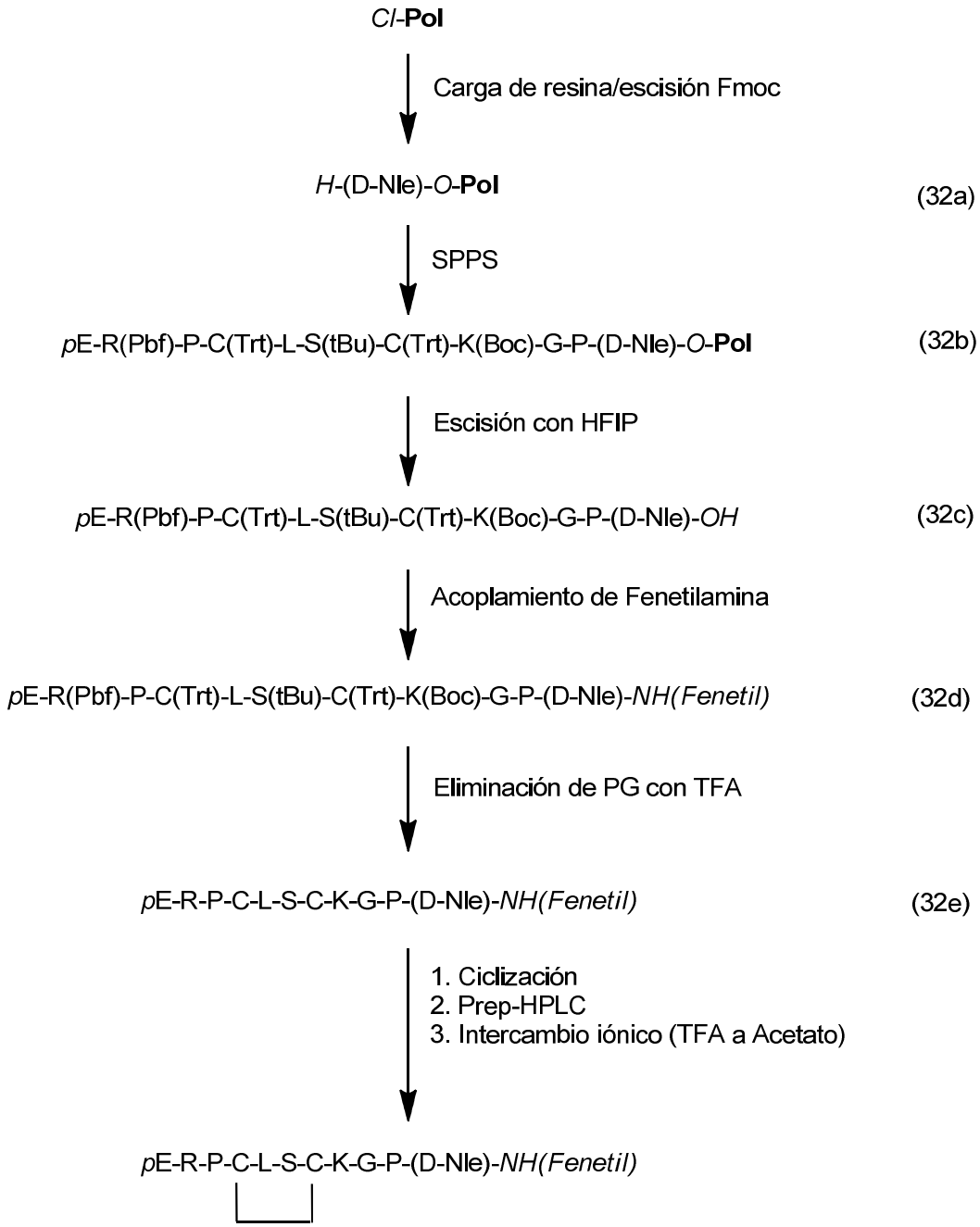
- Preparación de **Ejemplo 21**

  (Ciclización y Purificación)

Se disolvió **Intermediario 21c** (18 mg, 9,97 μmol) en H_2O (1,0 ml). Se añadió una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (0,24 ml, 12μmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente hasta que la LCMS mostró la terminación de la reacción. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O (24 μmol, 12 μmol) para apagar el exceso de I_2. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el Ejemplo 21 como un sólido blanco (12 mg, 6.32 μmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico B; t_R = 7,35 min) y UPLC-MS (Método analítico D; medido: $[M+2H]^{2+}$=730.355; calculado: $[M+2H]^{2+}$=730.361).

Example 32 Síntesis de Acetato de *p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetil)* (C^4-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 50)



Ejemplo 32

(SEQ ID NOS 61, 61, 61, 50 y 50 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 32a**

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

Se suspendió resina de cloruro de 2-clorotritilo (50,0 g, 85,0 mmol) en DCM (400 ml), la suspensión se agitó durante 10 min y después el disolvente se drenó, la resina se lavó con DCM (3 x 200 ml). A continuación, una solución de Fmoc-D-Nle-OH (24,0 g, 68,0 mmol) y DIPEA (96,5 ml, 552,5 mmoles) en DCM (120,0 ml) se añadió a la resina, la suspensión se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió otra porción de DIPEA (22,7 ml, 127,5 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

La mezcla de reacción se drenó y la resina se lavó con DCM (3 x 250 ml) durante 2 minutos cada vez. La resina se inactivó con una mezcla de DCM / MeOH / DIPEA (70:15:15) (2 x 250 ml) durante 10 minutos cada vez.

El grupo Fmoc se escindió por tratamiento de la resina con piperidina / DMF (1:3) (1 x 300 ml) durante 5 min. la resina se drenó entonces (1 x 300 ml) durante 15 min, seguido por pasos de lavado: DMF (6 x 250 ml, 2 min cada vez), isopropanol (2 x 250 ml, 2 min cada vez) y TBME (6 x 250 ml, 2 min cada vez). La resina se secó bajo vacío a 35 ° C durante 24 horas para proporcionar **Intermediario 32a** (57,8 g, carga = 1,08 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 32b**

  (Ensamblaje de péptido lineal)

Intermediario 32a (18,5 g, 20,0 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptido automático (CSBIO536™). Un ciclo de acoplamiento se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (3,0 eq), DIC (3,0 eq), HOBt (3,0 eq), DMF (ver tabla abajo)
- Lavado: DMF (4 x 150 mL, 2 min cada vez).
- Desprotección Fmoc: Piperidina/DMF (1:3) (150 mL durante 5 min luego 150 mL durante 15 min).

- Lavado: DMF (6 x 150 mL, 2 min cada vez).

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt

Después de ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (6 x 250 ml, 2 min cada vez), isopropanol (6 x 150 ml, 2 min cada vez) y TBME (6 x 150 ml, 2 min cada vez). La resina peptídica se secó durante la noche bajo alto vacío a 35 ° C para proporcionar el **Intermediario 32b** (57,6 g, 20,0 mmol).

- Preparación de **Intermediario 32c**

(Escisión de HFIP a partir de la resina)

Una porción del **Intermediario 32b** (27 g, 9,37 mmol) se suspendió en DCM (300 ml) y se agitó durante 15 min. La resina se escurrió y después se trató con HFIP / DCM (3:7) (3 x 270 ml, 15 min cada vez). La solución de escisión se separó por filtración y se recolectó. La resina se lavó con DCM (3 x 300 mL). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. La resina peptídica se secó durante la noche bajo alto vacío a 35 ° C para proporcionar **Intermediario 32c-Lote1** (23,5 g, 9,37 mmol).

El procedimiento anteriormente mencionado se repitió con otra porción de **Intermediario 32b** (28,0 g, 9,72 mmoles), proporcionando **Intermediario 32c-Lote2** (26,1 g, 9,72 mmoles).

- Preparación de **Intermediario 32d**

(Acoplamiento en fase de solución de fenetilamina)

Se disolvieron **Intermediario 32c-Lote2** (20,0 g, 7,44 mmol, 1,0 eq) y HATU (5,23 g, 13,8 mmol, 1,85 eq) se disolvieron en DMF (400 ml). Se añadió una solución de fenetilamina (1,67 g, 13,8 mmol, 1,85 eq) en DMF (60 ml) y DIPEA.

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y después se enfrió a 0 ° C y después se añadió salmuera (460 ml). La suspensión se agitó durante 10 min y después el producto se aisló por filtración. La torta de filtro se lavó con H_2O (300 ml), que luego se retiró cuidadosamente, después se disolvió en DCM (300 ml). La solución se secó sobre MgSO4 y después se concentró a sequedad al vacío. El producto crudo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyentes: DCM y DCM / iPrOH (8:2)) para proporcionar **Intermediario 32d-Lote1** (14,4 g, 6,6 mmol).

El mismo procedimiento se repitió con el **Intermediario 32c-Lote1** (23,4 g, 9,37 mmoles), con exclusión de la cromatografía ultrarrápida, proporcionando el **Intermediario 32d-Lote2** (28,0 g, 9,37 mmoles).

- Preparación de **Intermediario 32e**

(Eliminación del grupo protector)

Se disolvió **Intermediario 32d-Lote2** (28,0 g, 9,37 mmol) en TFA / DCM / EDT / TIS (90:5:2.5:2.5) (290 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

La solución de escisión se separó por filtración y se vertió sobre TBME frío (3 L) (0-4 ° C). La suspensión turbia se agitó en un baño de agua con hielo durante 30 min y después se filtró a través de un filtro de vidrio poro 4. El sólido blanco así obtenido se lavó con TBME (2 x 100 ml) después se secó al vacío a 35 ° C durante la noche para proporcionar el **Intermediario 32e-Lote1** (8,9 g, 5,9 mmol).

El mismo procedimiento se repitió con el **Intermediario 32d-Lote1** (14,4 g, 6,6 mmoles) proporcionando el **Intermediario 32e-Lote2** (9,6 g, 6,3 mmoles).

- Preparación de **Ejemplo 32***)*

1) Ciclización

Se disolvió **Intermediario 32e** (5,0 g, 3,3 mmol) en agua (500 ml). Una solución de yodo (1,18 g, 4,66 mmol, 1,41 eq) se añadió en ácido acético (93 ml) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió una solución de ácido ascórbico (1,03 g, 5,83 mmol, 1,77 eq) en agua (5,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min, se filtró y se almacenó a 4 ° C hasta purificación.

El mismo procedimiento de ciclización se repitió hasta que 18,3 g (12,1 mmol) de **Intermediario 32e** habían sido procesados.

2) Purificación

Las soluciones de péptido cíclico se sometieron a HPLC preparativa en porciones de 0,5-5,0 g de péptido por inyección. Se agruparon las fracciones que tienen una pureza superior al 95% y se liofilizó para proporcionar una cantidad total de 4,89 g (3,2 mmol) de péptido purificado (sal de TFA).

3) Formación de acetato por intercambio iónico

Se colocó 75 g (100 ml) de una resina de intercambio de aniones fuerte (intercambiador de iones III, Merck) en su forma OH en filtro de vidrio sinterizado (porosidad 3) y luego se añadió una solución de ácido acético / agua (1:3) (300 ml), la suspensión se agitó manualmente durante 2 min y luego se drenó la resina. El proceso se repitió con otra porción de ácido acético / agua (1:3) (300 ml). La resina se lavó con agua desionizada hasta que se observó un drenado neutral. A continuación, la resina se transfirió a una columna de 4 x 20 cm equipado con un filtro de vidrio sinterizado (porosidad 3).

Se disolvió 4,8 g de péptido purificado en agua desionizada (50 ml) y se añadió a la columna. El producto se eluyó con agua desionizada (200 mL). El control de la elución del producto se realizó por siembra en una cromatografía de capa delgada, las fracciones enriquecidas se agruparon y se secaron por congelación para proporcionar el **Ejemplo 32** (4,1 g, 2,9 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico B; t_R = 8,01 min) y UPLC-MS (Método analítico D; medido: $[M+2H]^{2+}$=643.328; calculado:

$[M+2H]^{2+}$=643.324). El contenido de acetato de metilo era de 7,99-8,27% y el contenido de agua era de 1,94-1,96%.

Los otros ejemplos se sintetizaron en analogía:

- **Ejemplos 1** a **8**, **10**, **11**, **13** a **17**, **20**, **28** a **31** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 12**.
- **Ejemplos 19**, **26**, **27**, **36-38** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 18**.
- **Ejemplos 22-25**, **33-35** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 21**.

Ejemplos bioconjugados

Ejemplo 39: Albumina-PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) en donde en donde PPA es ácido 3-(piridin-2-ildisulfanil)propanoico

Paso 1: Retiro del recubrimiento de la albumina

- Retiro del recubrimiento con TCEP

A una solución de albúmina (500 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 10 ml de búfer 1x PBS en un tubo de 15 ml se añadió una solución de clorhidrato de TCEP (1,074 mg en agua purificada a grado biológico) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se desaló y se lavó con dos filtros de centrífugación Amicon Ultra-4 (30K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 4K g durante 40 minutos y los filtrados se desecharon. Se añadió 3 ml de agua purificada a grado biológico a cada filtro para cada lavado (centrifugada a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 3 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (~20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (500 mg).

El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico F; medido: 66439.0; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (2 mg) en 400 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo

de 2 ml se añadió una solución de ácido 6-maleimidohexanóico (13 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 2 h. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66649.0; esperado: 66648.

- Desprotección con DTT

A una solución de albúmina (400 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 5 ml de búfer PBS 1x en un tubo de 15 ml se añadió una solución de DTT (0,232 µl, 2mg/ml en agua purificada a grado biológico) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 2 h, luego, se desaló y se lavó con veinte filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se desecharon. Agua purificada a grado biológico se agregó en la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 6 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (~20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (376 mg).

El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico G; medido: 66438.5; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (3 mg) en 400 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (25 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante la noche. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66608.0; esperado: 66606.

- Desprotección con Cisteína

A una solución de albúmina (120 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 1 ml de búfer de PBS a 50 mM, pH 8,0 en un tubo de 2 ml se añadió cisteína (10,94 mg) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se

desaló y se lavó con dos filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se desecharon. Se añadió agua purificada a grado biológico a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 min) y el proceso de lavado se repitió 5 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (4 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (108 mg).

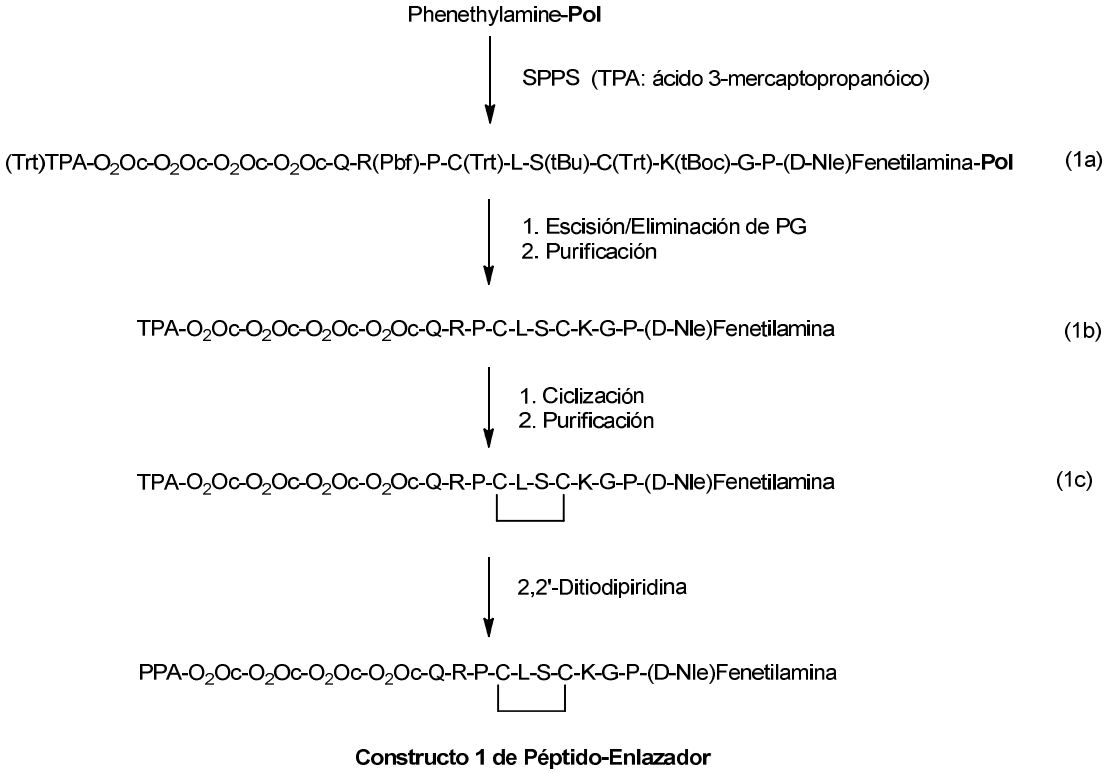
El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico G; medido: 66439; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (3 mg) en 500 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (15 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66608.0; esperado: 66606.

Paso 2:

Síntesis del Constructo 1 de Péptido-Enlazador: PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) en donde PPA es ácido 3-(piridin-2-ildisulfanil)propanóico



Constructo 1 de Péptido-Enlazador

(SEQ ID NOS 63, 62, 62 y 62 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 1a**

(Ensamblaje de péptido lineal) **O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62)**

- Resina de fenetilamina-AMEBA (89 mg, 0,25 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de	Temperatura	Potencia

		acoplamientos x Tiempo de reacción	ºC	Microondas
1	D-Nle	1 x 7,5 min	50	20
2	P	1 x 7,5 min	50	20
3	G	1 x 7,5 min	50	20
4	K(tBoc)	1 x 7.5 min	50	20
5	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
6	S(tBu)	1 x 7,5 min	50	20
7	L	1 x 7,5 min	50	25
8	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
9	P	1 x 7,5 min	50	25
10	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0
		2 x 7.5 min	50	25
11	Q(Trt)	1 x 7.5 min	50	25
12	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
13	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
14	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
15	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
16	TPA(Trt)	1 x 7.5 min	50	25

- Preparación de **Intermediario 1b**

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

Una solución hecha de 1,54 g de DTT y 0,75 ml de tioanisol en 6 ml de TFA / TIPS / agua (95:2,5:2,5) se añade a **Intermediario 1a** (0,25 mmol) y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante 5 h. La solución de escisión se separa por filtración y la resina se lava con TFA acuoso al 95%. Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vierten lentamente sobre éter dietílico frío (1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se

centrifuga y el sobrenadante se vierte. Se añade éter dietílico al residuo, la suspensión se agita en vórtex durante 3 min, se centrifugó, y el sobrenadante se vierte fuera. El proceso de lavado se repite 3 veces. El sólido se seca en alto vacío. El producto en crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el **Intermediario 1b**.

- Preparación del **Intermediario 1c**

(Ciclización y purificación)

Intermediario 1b se disuelve en H_2O (2,0 ml). Se añade una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (1.3 eq) en una porción a la solución agitada y la solución se agita durante la noche a temperatura ambiente y LCMS muestra la terminación de la reacción. Se añade ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O para apagar el exceso de I_2. El producto en crudo se purifica por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el **Intermediario 1c**.

- Preparación del Constructo 1 de Péptido-Enlazador **Intermediario 1c**

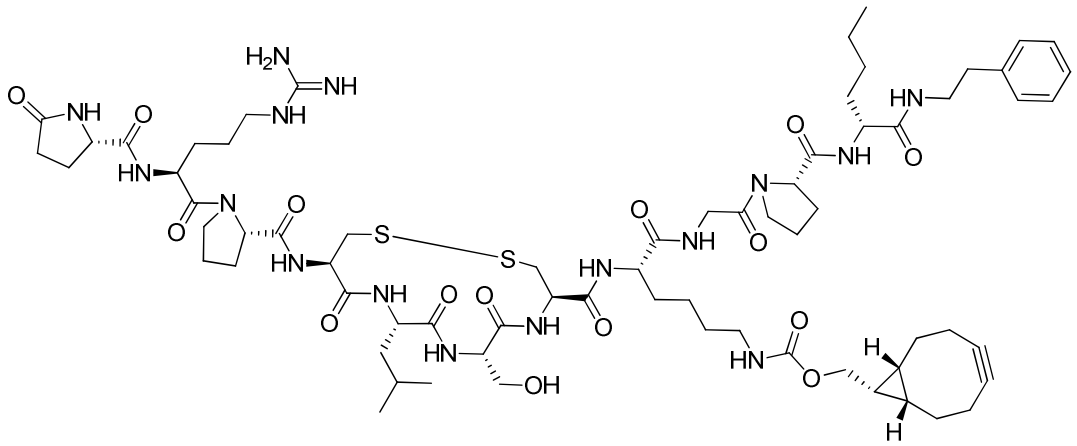
Una mezcla de **Intermediario 1c**, 2,2 '-ditiodipiridina (3 eq) en ACN se sacude a 25 ° C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluye con MeOH y se filtra. La solución se purifica por HPLC preparativa y se liofiliza a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Constructo 1 de Péptido-Enlazador**.

<u>Paso 3: Conjugación del constructo de péptido-enlazador/ Albúmina</u>

Una solución de HSA desprotegido (100 mg) en búfer PBS (6 ml) se trata con una solución de PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) (2 eq en agua). La solución resultante se sacude a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se desaló y se lavó con 4 filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugan a 13K g durante 10 minutos y los filtrados se desechan. Agua purificada a grado biológico se añade a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 13K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repite 6 veces. El conjugado se disuelve en agua (4 ml en total). La solución se transfiere a un tubo Falcon de 15 ml, y se liofiliza para proporcionar el **Ejemplo 39**.

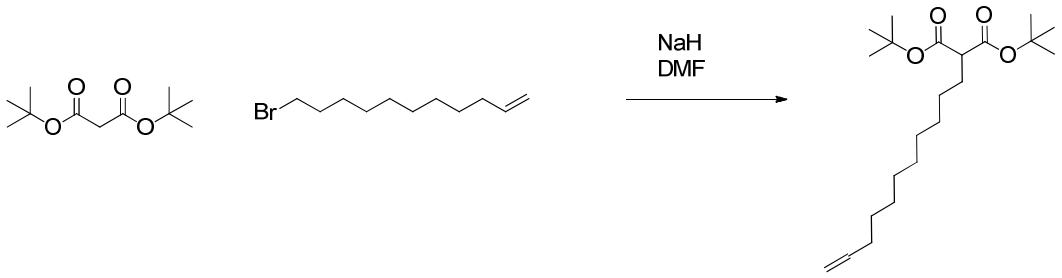
Ejemplo 40: Péptido cíclico de apelina conjugado con un ácido graso a través de un enlazador BCN-PEG:

Paso 1: Preparación de constructo de péptido cíclico de Apelina-BCN: Preparación de pE-R-P-C*-L-S-C*P-N_6[[(1α,8α,9α)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi]carbonil]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 64)



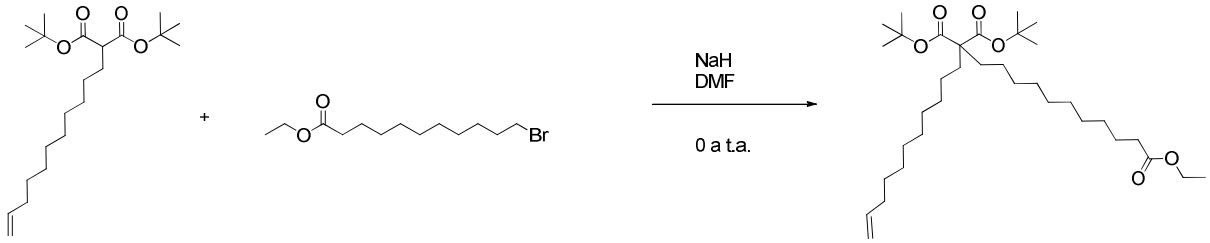
Una mezcla de pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) triacetato [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 50) (Ejemplo 32: 100 mg, 0,068 mmoles), bicarbonato de sodio (38 mg, 0,452 mmol) y agua (83 uL) en DMF (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación, se agregó carbonato de succinimidilo de (1R,8S)-biciclo [6.1.0] non-4-in-9-ilmetilo (Berry & Associates, 20 mg, 0,068 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se agregó 1 ml de aguaa la mezcla y la solución resultante se liofilizó para proporcionar un polvo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Paso 2: 2-(undec-10-in-1-il) malonato de di-terc-butilo



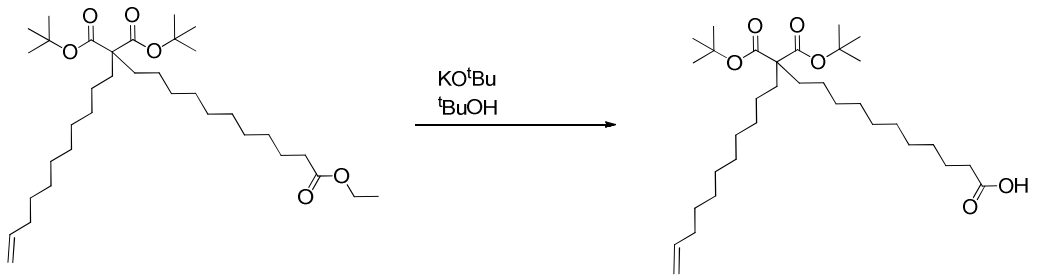
Malonato de di-terc-butilo (800 mg, 3,70 mmol) se disuelve en DMF (9 ml) a 0 ° C en atmósfera de N_2 y se añade NaH (148 mg, 3,70 mmol). La reacción se agita 30 minutos a 0 ° C y se añade 11-bromo-dec-1-eno (3,33 mmoles) por goteo lentamente, dando como resultado una solución de color amarillo. La reacción se agita a 0 ° C durante 2 horas y después se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. La mezcla se recoge en EtOAc (75 ml) y se lava con H_2O (25 ml). La capa acuosa se extrae con EtOAc (75 ml) y las capas orgánicas combinadas se secan sobre Na2SO4, se filtran y se concentran. La mezcla se purifica por columna ultrarrápida (12 g de cartucho de sílice, EtOAc / heptanos al 0-20%) y las fracciones se concentran para proporcionar el producto deseado.

Paso 3: docos-21-eno-1,11,11-tricarboxilato de 1-etilo de 11,11-di-terc-butilo



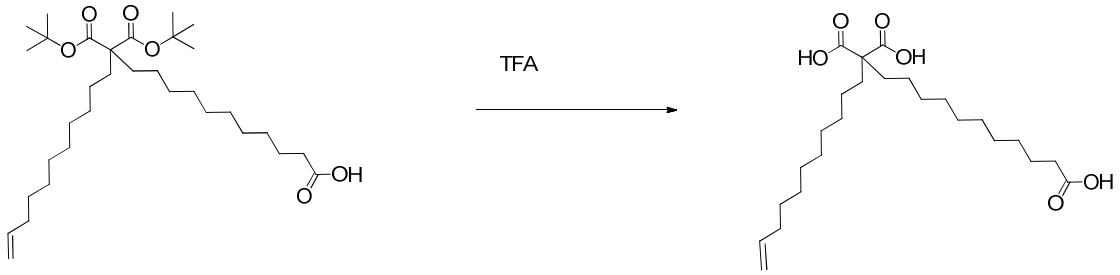
El compuesto del paso 2 (0,442 mmol) se disuelve en DMF (2 ml) a 0 ° C y se añade NaH (21,23 mg, 0,531 mmol). La reacción agitada a 0 ° C durante 15 minutos y 11-bromoundecanoato de etilo (143 mg, 0,486 mmol) se aagrega por goteo lentamente. La reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. La mezcla se diluye con EtOAc (40 ml) y se lava una vez con H_2O (25 ml). La capa acuosa se extrae una vez con EtOAc (40 ml) y las capas orgánicas se combinan, se secan sobre Na_2SO_4, se filtran y se concentran. La muestra se disuelve en 1 ml de DCM y se purifica por columna ultrarrápida (columna de sílice de 12 g, EtOAc / heptano al 0-20%, 15 min). Las fracciones se combinaron y se concentraron para proporcionar el producto deseado.

Paso 4: ácido 12,12-bis(tert-butoxicarbonil)tricos-22-enóico



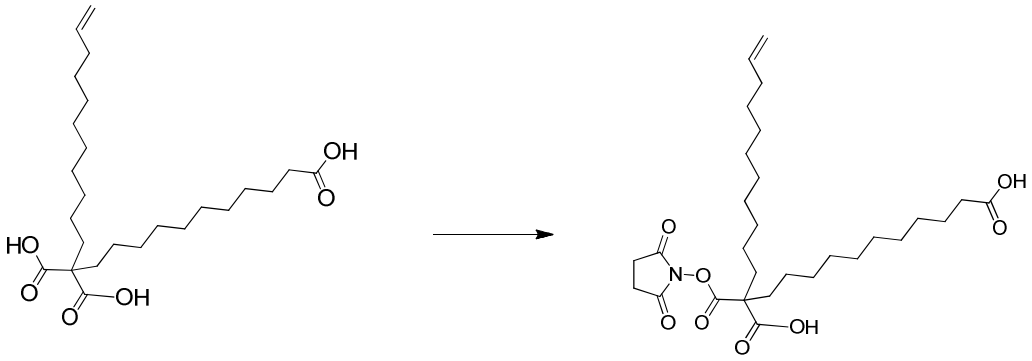
A una solución del compuesto de la etapa 3 (0,037 mmol) en $_t$BuOH (1 ml) se añade una solución de KOtBu (114 mg, 1,012 mmol) en $_t$BuOH (2 ml) a 30 ° C en atmósfera de N_2. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se monitorea por TLC (1:1 EtOAc / hexanos, $KMnO_4$, reflujo). Después de que se completa la reacción, la mezcla de reacción se inactiva con HCl 1 M (20 ml) y se extrajo dos veces con EtOAc (25 ml). Las capas orgánicas se recolectan y se secan sobre Na_2SO_4, se filtra, y se concentra. El material se llevó al siguiente paso sin purificación adicional.

Paso 5: Ácido docos-21-ene-1,11,11-tricarboxílico



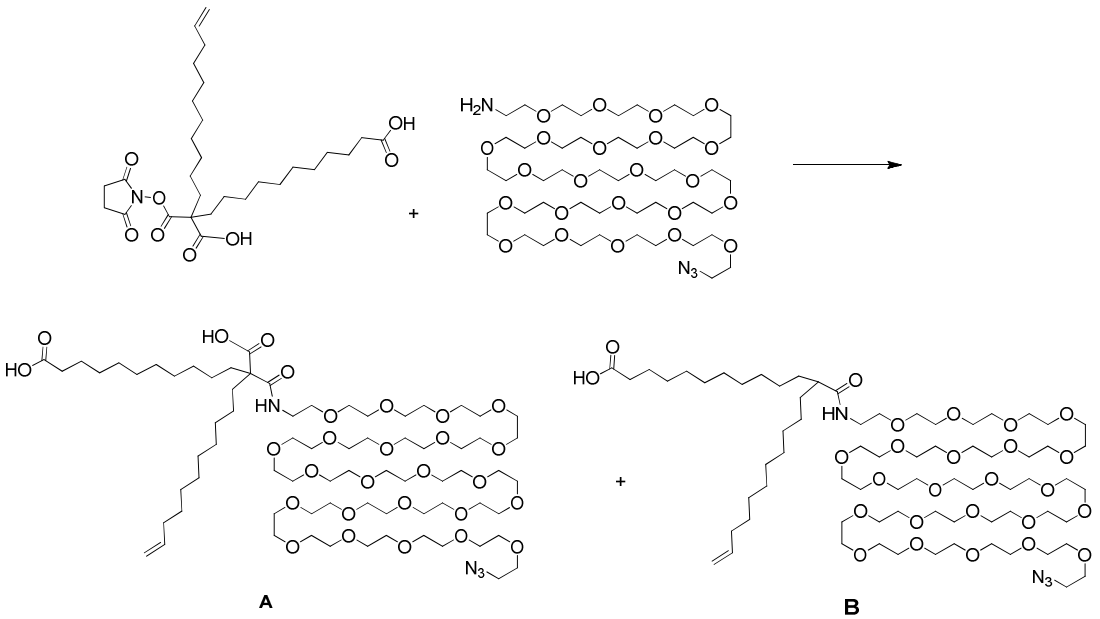
TFA (2 ml) se añade a un compuesto del paso 4 (0,022 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se diluye con DCM (10 ml) y se concentra. El material se recoge en EtOAc (10 ml) y se lava con H_2O (20 ml). Las capas orgánicas se recolectan y se secan sobre Na_2SO_4, se filtran, y se concentran. El material crudo se disuelve en 1 ml de MeOH y se purifica mediante HPLC desencadenado por MS (columna de Sunfire 30x50mm 5 um ACN/H_2O W / TFA al 0,1% 75ml/min, inyección de 1,5 ml, ACN al 45-70% durante 3,5 min).

Paso 6: Ácido 2-(((2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi) carbonil)-2-(undec-10-en-1-il)tridecanodióico



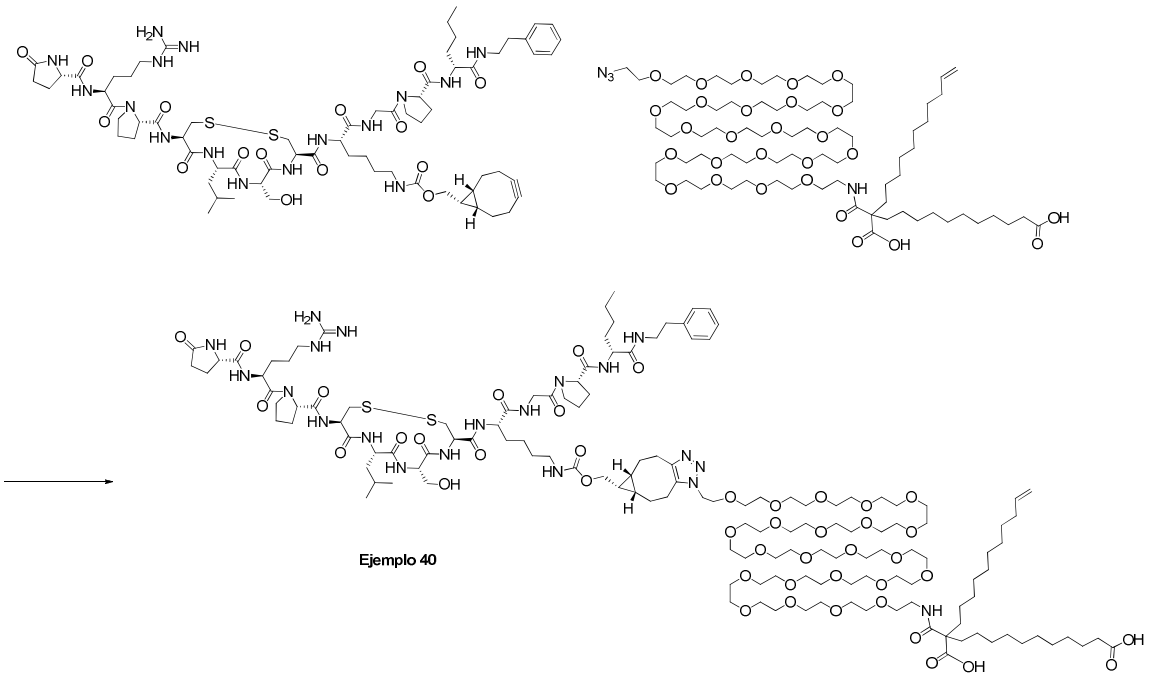
DCC (187 mg, 0.908mmol) en DCM (2 ml) se añadió a una solución de N-hidroxisuccinimida (99 mg, 0.862mmol) y ácido docos-21-ene-1,11,11 tricarboxílico (Intermediario 45: 400 mg, 0.908mmol) en DCM (7 ml) y THF (0,7 ml). La reacción se agitó durante la noche antes de que el disolvente se evaporara. El residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm; ACN 55-80% / agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título (155 mg, 0.288mmol, 32%): por LCMS Método E Rt = 1.51min, M + H 538.3; ^{1}H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,16-1,46 (m, 28 H) 1,60-1,87 (m, 3 H) 1,91-2,17 (m, 5 H) 2,38 (t, J = 7,03 Hz, 2 H) 2,86 (s ancho, 4 H). 3,68 (dd, J = 11,25, 7,34 Hz, 1 H) 3,78 (dd, J = 11,31, 5,20 Hz, 1 H) 3,99-4,10 (m, 1 H).

Paso 7: enlazador de PEG con ácido graso



Azido-dPEG23-amina (Quanta Biodesign: 164 mg, 0.149mmol) y compuesto de la etapa 6 (80 mg, 0.149mmol) se disolvieron en THF (2,5 ml). Se añadió DIPEA (39µL, 0.233mmol) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm; ACN al 45-70%/ agua + TFA al 0,1%) para proporcionar compuestos A (97 mg, 0.061mmol, 41%) y B (32 mg, 0.021mmol, 14%): LCMS ZQ1 Método E Rt = 1.35min, $[M+2H]_{+2}$ 761,9; ^{1}H RMN (400 MHz, ACETONITRILO-*d3*) δ ppm 1.5 a 1.18 (m, 3 H) 1,19-1,32 (m, 20 H) 1,36 (t, J = 7,15 Hz, 1 H) 1,48-1,59 (m, 2 H) 1,65-1,75 (m, 2 H) 2,01-2,06 (m, 2 H) 2,25 (t, J = 7,46 Hz, 2 H) 3,33-3,39 (m, 2 H) 3,39-3,44 (m, 2 H) 3,50-3,67 (m, 98 H) 4,84-4,95 (m, 1 H) 4,95-5,06 (m, 1 H) 5,83 (ddt, J = 17,07, 10,29, 6,68, 6,68 Hz, 1 H) 7,31 (t, J = 5,44 Hz, 1 H); Método LCMS E Rt = 1.50min, [M +2 H] 2 739,9; 1H RMN (400 MHz, ACETONITRILO-*d3*) δ ppm 1,16-1,42 (m, 30 H) 1,42-1,63 (m, 5 H) 2,00-2,07 (m, 2 H) 2.22 a 2.28 (m, 2 H) 2,40-2,52 (m, 2 H) 3,25-3,33 (m, 2 H) 3,33-3,42 (m, 2 H) 3,42-3,50 (m, 2 H) 3,50-3,68 (m, 88 H) 4,86-5,06 (m, 2 H) 5,83 (ddt, J = 17,04, 10,26, 6,71, 6,71 Hz, 1 H) 6,40-6,74 (m, 1 H).

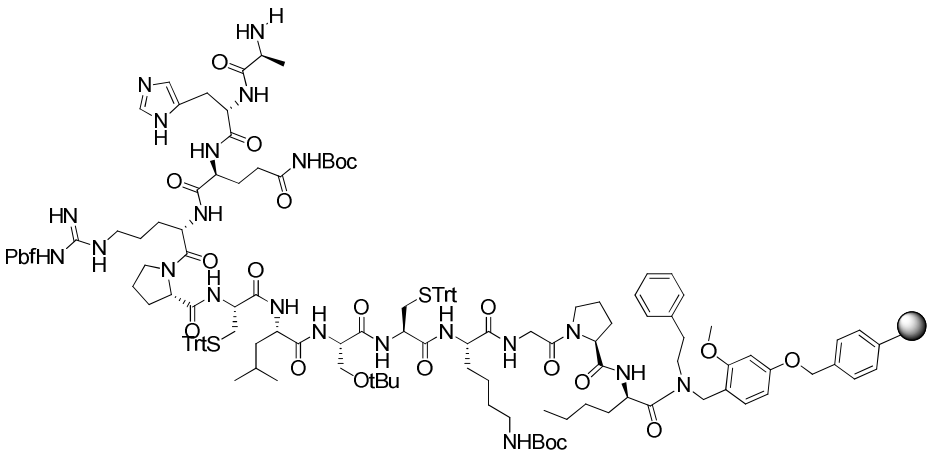
Paso 8: Preparación de Ejemplo 40:



Una mezcla de pE-R-P-C*-L-S-C*-N^6-[[(1α,8α,9α)-bicIclo[6.1.0]non-4-In-9-ilmetoxi]carbonil]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 64) (50 mg del producto de del paso 1 en 1 ml de agua, 0,034 mmoles) y el compuesto A del paso 7 (52 mg, en 268 ul de agua) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La mezcla de reacción se purificó luego por HPLC preparativa (columna Sunfire 30x50mm 5 um ACN/H2O w / 0,1% de TFA 75ml/min, ACN al 15-40% 5 min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar el producto del título como sal de TFA (24 mg, 21%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + Ácido Fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 5,15 min): Tiempo de retención: 2,77 min; MS $[M+2]_{2+}$: observado: 1491.8808, calculado: 1491,8560.

Ejemplo 41: Péptido cíclico de apelina conjugado con un ácido graso en el extremo N

Paso 1: Síntesis de A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetil amina (SEQ ID NO: 65) **Intermediario 41a**



Resina fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,1 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM Liberty Blue Microwave) con Arg doble estándar para residuos de Arg y tiempo doble acoplado a DNle. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se define como sigue:

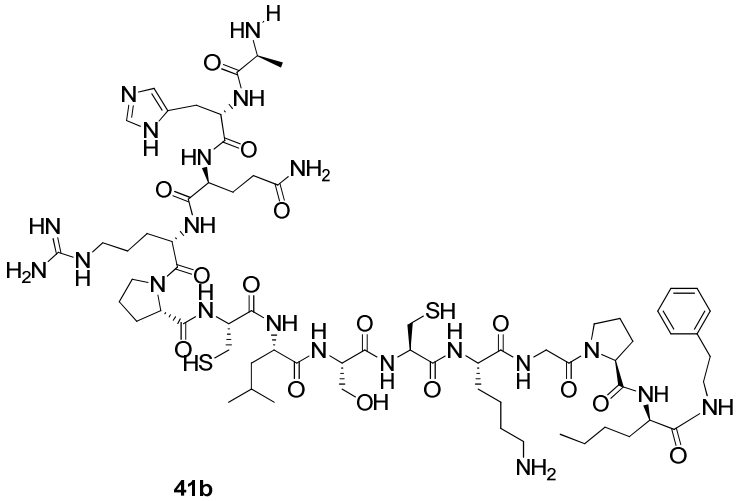
- Acoplamiento de aminoácidos: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 X 7 mL)
- Desprotección Fmoc: Piperidina al 20%/HOBt a 0.1 M (2 x 7 mL)
- Lavado: DMF (4 x 7 mL luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 ml) y DCM (2 x 50 ml) después se secó al vacío para proporcionar el **Intermediario 41a** (276 mg, 0,1 mmol).

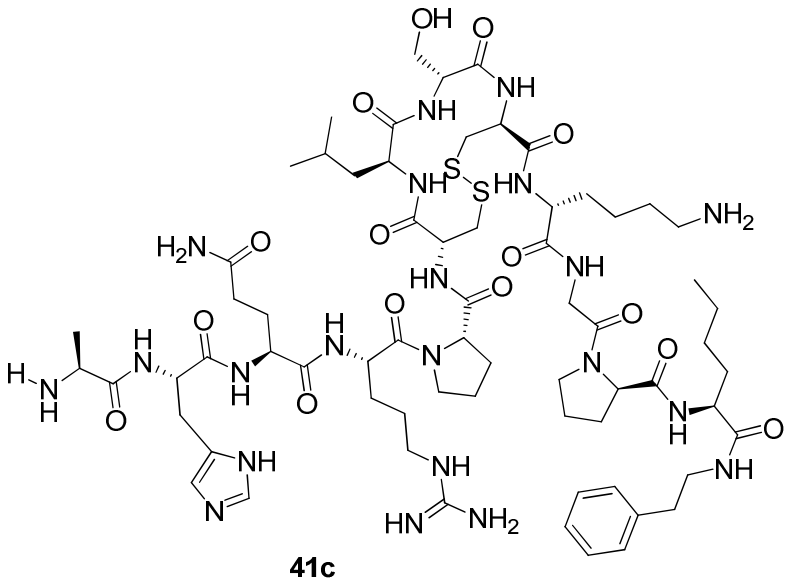
Paso 2: Preparación de **Intermediario 41b** (Escisión del péptido de la resina)



41b

Intermediario 41a (276 mg, 0,1 mmoles) se combinó con 4 ml de solución de TFA (37 ml de TFA, 1 ml de H_2O, 1 ml de TIPS, 3,06 g de DTT) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 ml de Et_2O frío. La solución se agitó en vórtice y se deja reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et_2O frío (40 ml cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó al vacío durante la noche dando **Intermediario 41b-lote 1** (17,4 mg, 0,012 mmol). LCMS (producto de análisis SQ2-Peptídico-Acídico-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 1.83 minutos, MS [M+H] 1513.5.

Paso 3: Preparación de **Intermediario 41c** (Ciclización de residuos de cisteína)

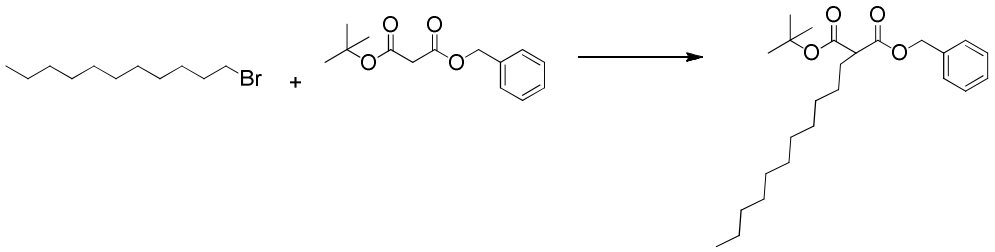


41c

Se disolvió **Intermediario 41b-lote 1 y 2** (29,6 mg, 0,020 mmol) en agua (3 ml) y 10 gotas de DMSO para proporcionar una solución ligeramente turbia. Se añadió yodo (50 mM en HOAc, 0,783 ml, 0,039 mmol) por goteo lentamente y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante la noche. El análisis de LCMS de la reacción cruda mostró la conversión completa del material de partida. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M por goteo hasta que el color se disipó. El material se purificó por HPLC activado por MS. La liofilización de las fracciones agrupadas dio 7 mg del producto deseado como un polvo blanco (4,63 µmol, 24%).

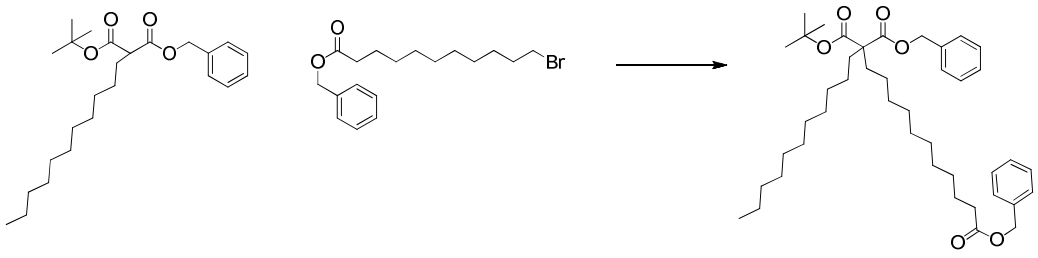
LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 0.90 minutos, MS [M+H] 1511.8.

Paso 4: 3-Terc-butil-2-undecilmalonato de 1-bencilo



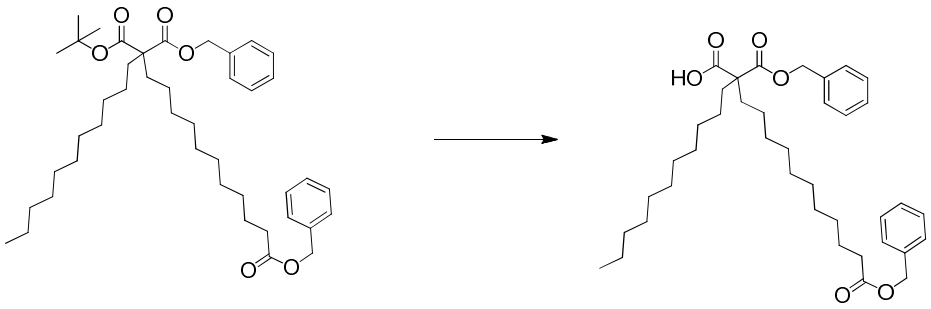
A una suspensión de NaH (160 mg, 4,0 mmoles) en DMF (8 ml) a 0 º C bajo atmósfera de N_2, se añadió malonato de terc-butilo de bencilo (1,0 g, 4,0 mmoles) en DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 50min después de lo cual se añadió 1-bromoundecano en DMF (2 ml). Después de una hora adicional de agitación, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo durante la noche. Et_2O (100 ml) y agua (20 ml) se añadieron a la partición de la reacción. La fase acuosa se extrajo con Et_2O (100 ml), y los orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (C18 12 g, ACN al 40-100%/ agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (1,14g, 2.82mmol, 71%): LCMS Método F Rt = 1.58min, M + Na 427.4; $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84-0,96 (m, 3 H) 1,28 (br. s, 12 H) 1,31 (m, J = 3,90 Hz, 6 H) 1,41 (s, 9 H) 1,88 (q, J = 7,38 Hz, 2 H) 3,29 (t, J = 7,58 Hz, 1 H) 5,19 (q, J = 12,27 Hz, 2 H) 7,30-7,42 (m, 5 H).

Paso 5: Docosano-1,11,11-tricarboxilato de 11-terc-butilo de 1,11 dibencilo



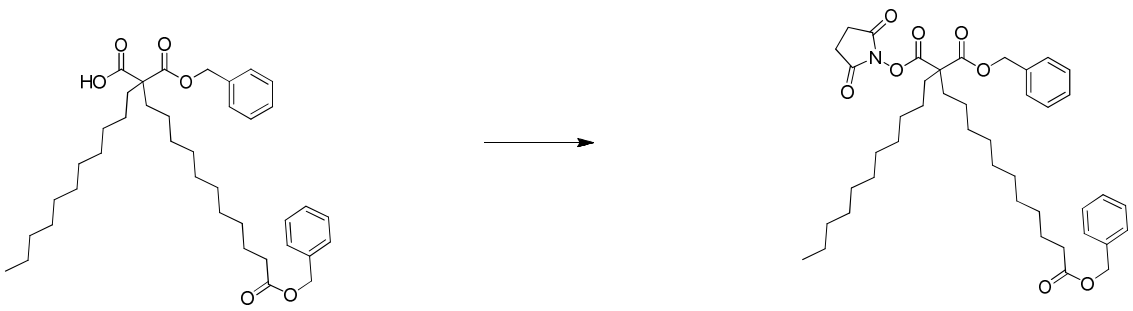
El compuesto del título se sintetizó de una manera similar al paso 3 del Ejemplo 40 utilizando el compuesto de la etapa 4 (177 mg, 0.284mmol) como material de partida para producir un aceite incoloro (153 mg, 0.213mmol, 75%): $_1$H RMN (400 MHz , CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 1.12 a 1.21 (m, 2 H) 1,21-1,37 (m, 30 H) 1.66 (quin, J = 7,40 Hz, 2 H) 1,89-2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, J = 7,58 Hz, 2 H) 2,84 (br. s, 4 H.) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30-7,47 (m, 10 H).

Paso 6: Ácido 13- (benciloxi)- 2-((benciloxi) carbonil)- 13- oxo- 2- undeciltridecanóico



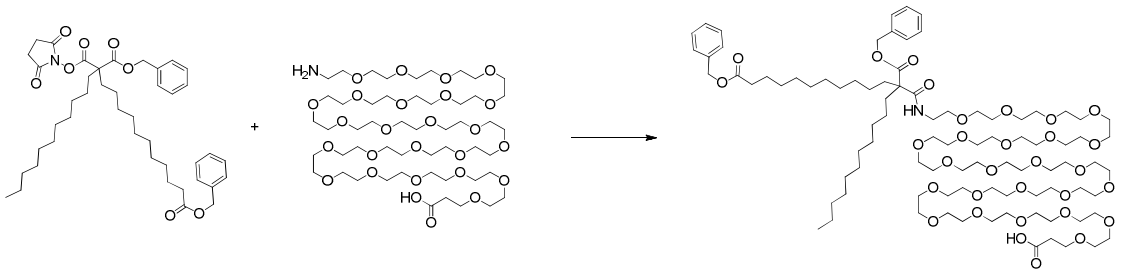
A una solución de un compuesto de la etapa 5 (200 mg, 0.295mmol) en DCM (3 ml) se añadió TFA (0,6 ml), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (sílice 12 g, EtOAc / HEP al 0-15%) para proporcionar el compuesto del título (177mg, 0.284mmol, 96%): ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0.87-0.94 (m, 3 H) 0.94-1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23-1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.78-1.91 (m, 2 H) 1.93-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31-7.44 (m, 10 H).

Paso 7: Docosano-1,11,11-tricarboxilato de 11-(2,5-dioxociclopentilo) de 1,11-dibencilo



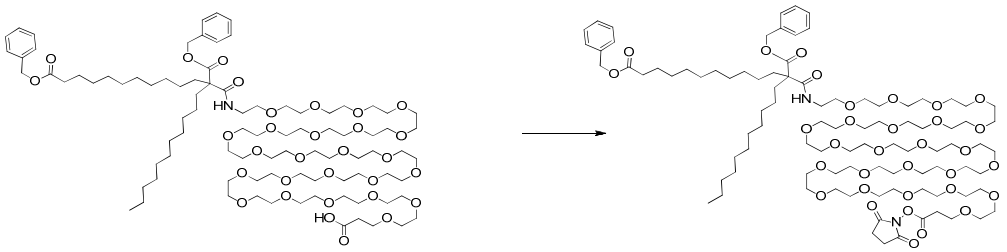
El compuesto del título se sintetizó de una manera similar al paso 6 del Ejemplo 40 utilizando el compuesto de la etapa 6 (177 mg, 0.284mmol) como material de partida para producir un aceite incoloro (153 mg, 0.213mmol, 75%): $_1$H RMN (400 MHz , CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 1.12 a 1.21 (m, 2 H) 1,21-1,37 (m, 30 H) 1.66 (quin, J = 7,40 Hz, 2 H) 1,89-2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, J = 7,58 Hz, 2 H) 2,84 (br. s, 4 H.) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30-7,47 (m, 10 H).

Paso 8:



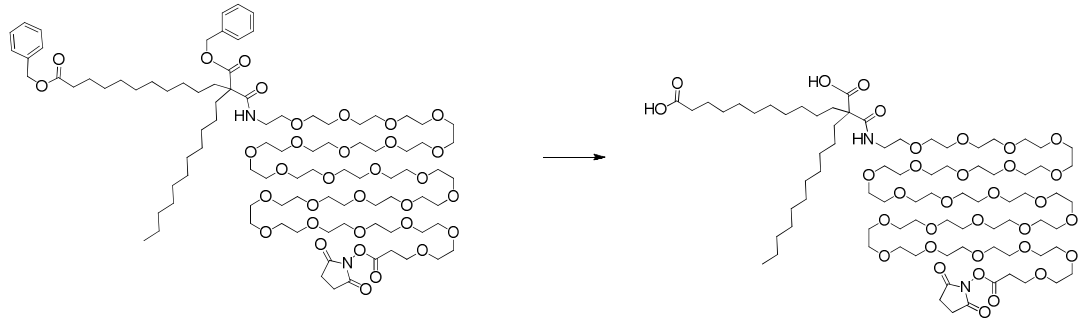
Una solución del Intermediario **34** (145 mg, 0.201mmol) en THF (1,5 ml) y DCM (1,5 ml) se añadió a un vial cargado con amino-PEG24-ácido. Se añadió DIPEA (88µL, 0.504mmol) y la reacción se agitó en un agitador de placas durante 15 hrs. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de fluido supercrítico (Waters HILIC 20x150mm; MeOH al 15-25% / CO2) para proporcionar el Intermediario **35** (151 mg, 0.086mmol, 43%): LCMS Método E Rt = 1.30min, [M+2H]+2 876.4; ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0.86-0.93 (m, 3 H) 0.93-1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23-1.37 (m, 15 H) 1.61-1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52-3.59 (m, 2 H) 3.59-3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31-7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H).

Paso 9:



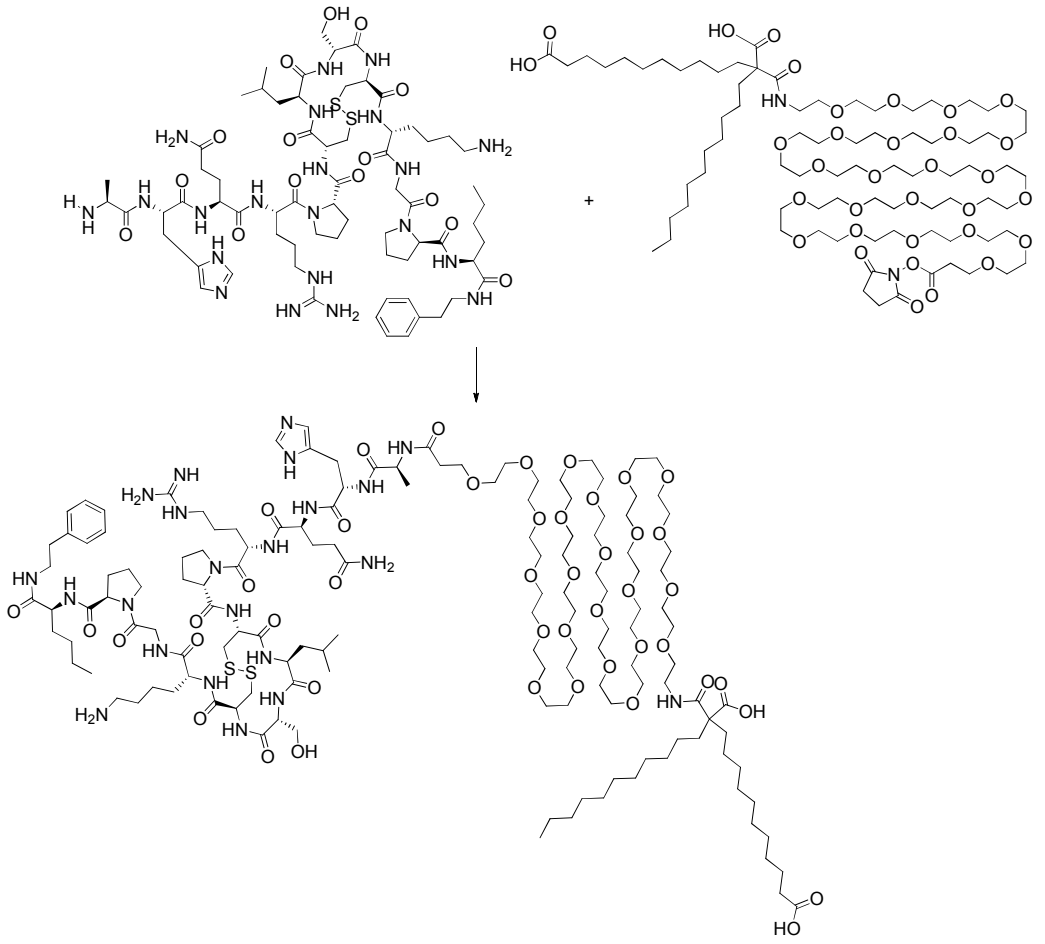
DCC (22mg, 0.103mmol) en DCM (2 ml) se añadió a una solución de Intermediario **35** (150mg, 0.086mmol) y N-hidroxisuccinimida en DCM (1,5 ml). La reacción se agitó durante 1.5 horas. Se añadió N-hidroxisuccinimida adicional (10 mg) en THF (0,5 ml) y DCC (22 mg) en DCM (0.265mL) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (sílice 12, EtOAc al 0-5% / HEP) para proporcionar el Intermediario **36** (159mg 96%) como un sólido blanco: LCMS Método G Rt = 1.55min, $[M+H_3O+H]^{+2}$ 933.9 .

Paso 10:



A una solución del compuesto de la etapa 9 (159 mg, 0.086mmol) en THF (5 ml) se le añadió una suspensión de Pd al 10% sobre carbono (4,6 mg, 4,3 µol) en THF (1 ml). La reacción se colocó bajo hidrógeno y se agitó durante 40min. Se añadió más Pd sobre carbono (7 mg, 6,5µmol) y luego se agitó durante otra 1 hora bajo atmósfera de hidrógeno. La reacción se hizo pasar a través de un filtro de membrana y el filtrado se evaporó. El residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm, ACN al 45-70% / agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título (83 mg, 0.047mmol, 54%): LCMS Método G Rt = 1.03min, [M+2H]+2 835.2; ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δppm 0.84-0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21-1.39 (m, 30 H) 1.57-1.68 (m, 2 H) 1.69-1.80 (m, 2 H) 1.97-2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 3.51-3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 7.45 (t, *J*=4.46 Hz, 1 H)

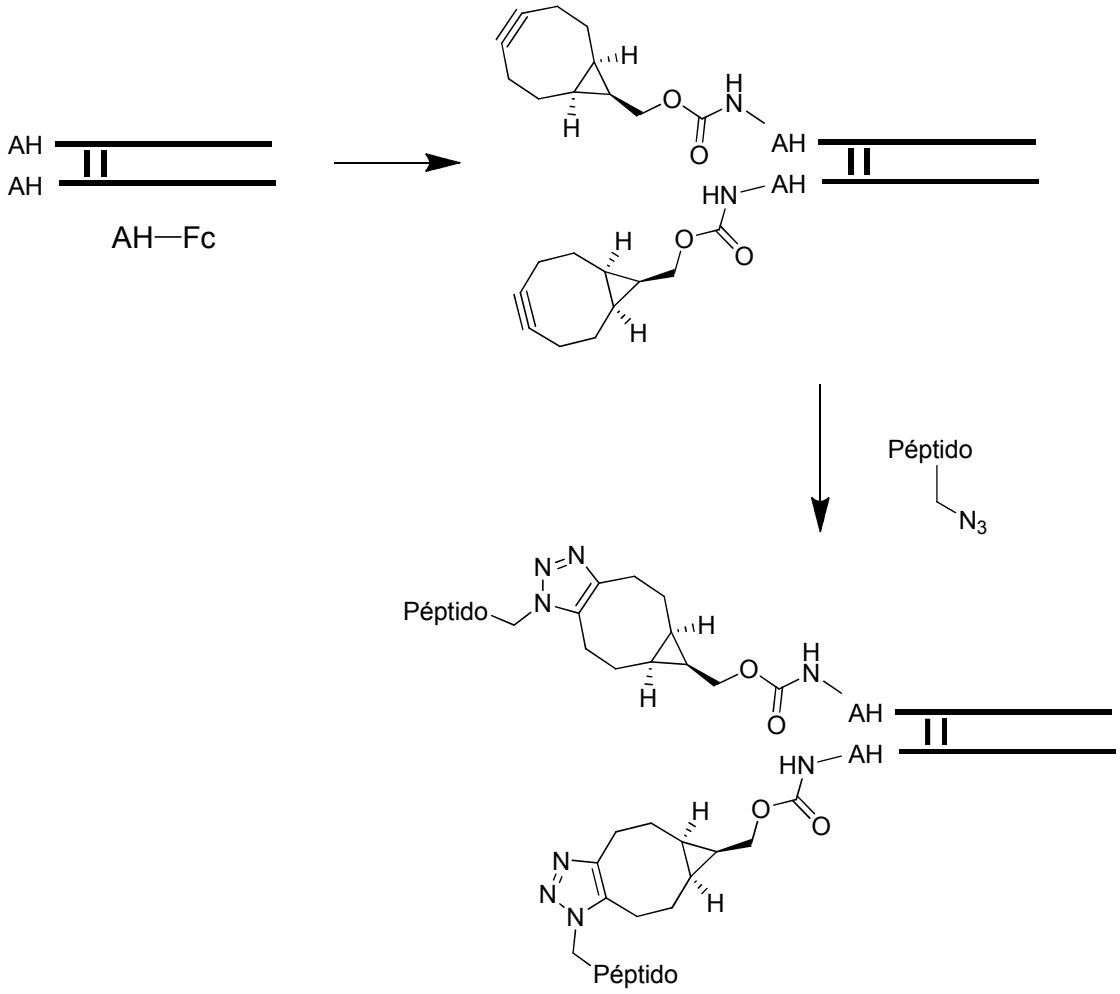
Paso 4: Preparación de conjugado que comprende constructo de Apelina amina de A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetil (SEQ ID NO: 65) y constructo de ácido graso-PEG (conjugación de extremo N)- Ejemplo 41



Una solución de 10 mg / ml de ácido graso-NHS (producto A del paso 7 del Ejemplo 40) se preparó en H_2O. Se añadió **Intermediario 41c** (1,5 mg, 0,993 µmol) se disolvió en 30 mM de búfer de NaOAc pH 4 (672 µl) y ácido NHS-graso (0,850 ml, 5,10 mmol). La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas en cuyo punto se agregó 1,5 mg adicionales de ácido graso-NHS (10 mg / ml en H_2O) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadieron 8 mg de ácido graso-NHS (10 mg / ml en H_2O) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 días y se añadió 1,7 mg de NHS-ácido graso (10 mg / ml en H_2O). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se purificó por HPLC activada por M para proporcionar 1,7 mg del compuesto del título como un polvo blanco (0,510 µmol, 51%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 3.87 minutos, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9.

Ejemplo 42: Conjugación de AH-Fc con péptido cíclico de apelina

Esquema General



Paso 1: preparación de constructo de AH-Fc:

Clonación de Constructo:

Un fragmento de ADN que contiene al péptido señal de la cadena kappa de la IgG de ratón seguido de una secuencia de Fc humana y una secuencia bis corta de aminoácidos (AH) fue el codon optimizado mediante la síntesis del gen (GeneArt) con los sitios de restricción 5'-NheI y 3'-EcoRI. La secuencia resultante se digirió con restricción con NheI y EcoRI y se ligó en los sitios NheI y EcoRI de vector pPL1146, corriente abajo de un promotor de CMV. La ligación se transformó en células E. coli DH5α y colonias que contienen el inserto correcto

se identificaron por secuenciación de ADN. La secuencia mostrada es para la cadena con sentido y corre en la dirección 5 'y 3'.

AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCA
GCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAG
ACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTC
TCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCAT
AATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTG
TCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCA
AAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAA
AGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAAT
GACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC
ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACA
CCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGA
TAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGC
CCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGAA
TTC (SEQ ID NO: 66)

Secuencia del constructo AH-Fc:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG **AH**DKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 67)

Expresión y Purificación de Proteínas de AH-Fc:

ADN plásmido de expresión de AH-Fc se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1 x 10_6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) en matraz de 3 L durante 4 días a 37 ° C.

La proteína de AH-Fc se purificó a partir de medio condicionado clarificado. Brevemente 500 ml de medio condicionado se hizo fluir a través de una columna HiTrap MabSelect SuRE de 5 ml (GE Life Sciences) a 4 ml / min. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-114 al 0,1% y luego la proteína de AH-Fc se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, neutralizado con Tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. Los rendimientos de proteína fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio acondicionado y los niveles de endotoxinas eran <1 EU/ mg, medidos por la prueba de Charles River ENDOSAFE PTS.

Control de Calidad de Proteínas de AH-Fc:

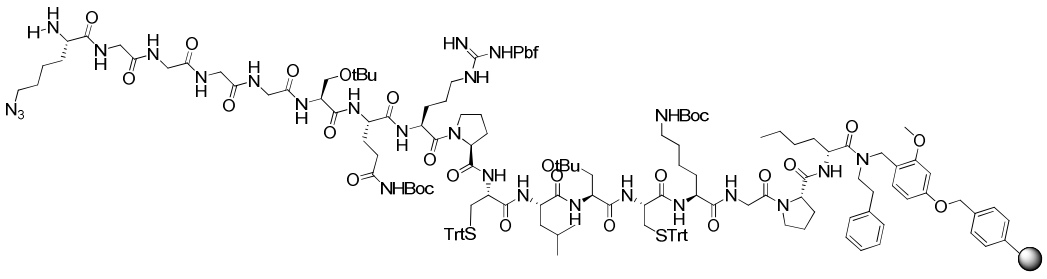
LC / MS de proteínas de AH-Fc: Los picos fueron heterogéneos y aproximadamente 3 kDa mayores a lo esperado para los dímeros. Esto es característico de glicosilación ligada a N esperada para Fc que tiene un sitio de glicosilación ligada a N de consenso.

LC / MS de proteínas AH-Fc reducidas, N-desglicosiladas por N: proporcionó picos agudos. El peso molecular de AH-Fc fue como se esperaba. Las cisteínas en el extremo C parecen proteger la proteína de la escisión.

Exclusión por tamaño analítica en Superdex 200: Las proteínas de apelina Fc tienen entre 89 y 100% de dímero, 0 a 10% de tetrámero, y 0 a 1% de agregado.

SDS/PAGE de reducción: Todas las proteínas emigraron predominantemente como monómeros del tamaño esperado.

Paso 2: Síntesis de NH_2-AzidoLys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetilamina (SEQ ID NO: 68)



Resina fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,25 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM Liberty Blue Microwave) con Arg doble estándar para residuos de Arg y D-Nle y tiempo doble

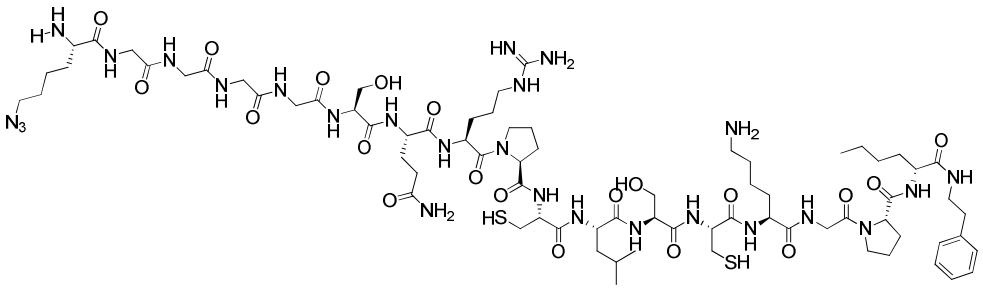
acoplado a Azidolisina. Los aminoácidos se prepararon como solución a 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 X 7 mL)
- Desprotección Fmoc: Piperidina al 20%/HOBt a 0.1 M (2 x 7 mL)
- Lavado: DMF (4 x 7 mL luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-AzidoLys-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU

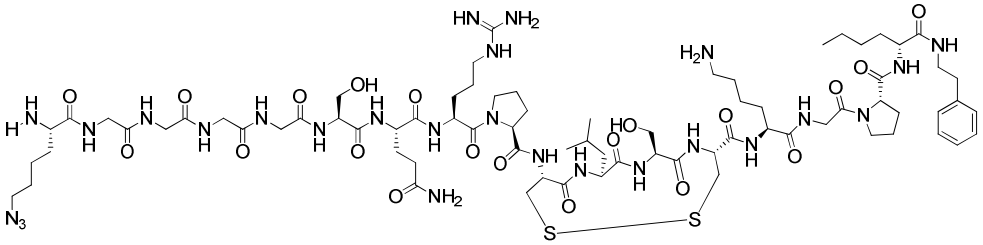
Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 ml) y DCM (2 x 50 ml) después se secó al vacío para proporcionar el **Intermediario 42a** (770 mg, 0,250 mmol).

Paso 3: Preparación de **Intermediario 42b** (Escisión del péptido de la resina)



Intermediario 42a (770 mg, 0.250, mmoles) se dividió en la mitad y cada muestra se combinó con 6 ml de solución de TFA (37 ml de TFA, 1 ml de H_2O, 1 ml de TIPS, 2,569 g de (20 eq.) DTT) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 ml de Et_2O frío. La solución se agitó en vórtice y se deja reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et_2O frío (40 ml cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó bajo vacío durante la noche y se purificó por HPLC activada por M proporcionando el **Intermediario 43b** como un polvo blanco (80 mg, 0,045 mmol, 80%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 2.32 minutos, MS [M+H+2/2] 888.0.

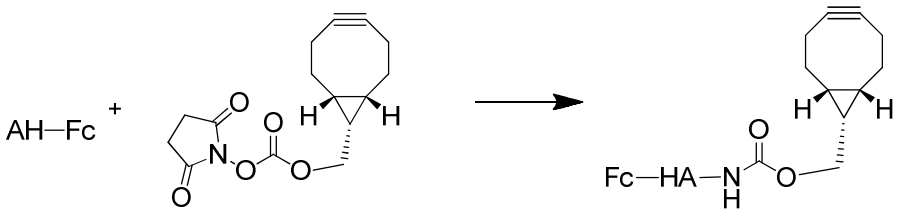
Paso 4: Preparación de **Intermediario 42c** (Ciclización de residuos de cisteína)



Intermediario 42b (80 mg, 0,045 mmoles) se disolvió en agua (1,25 ml) y se añadió yodo (50 mM en HOAc, 1,804 ml, 0,090 mmol) lentamente por goteo y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 horas. El análisis de LCMS de la reacción cruda mostró la conversión completa del material de partida. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M por goteo

hasta que el color se disipó. El material se purificó por HPLC activado por MS. La liofilización de las fracciones agrupadas dio 20,1 mg del producto deseado como un polvo blanco (0,045 mmol, 25%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 2.17 minutos, MS [M+H+2/2] 886.8.

Paso 5: Preparación de **Fc-AH BCN** (*Instalación de un click de manipulación en el extremo N de AH-Fc*)

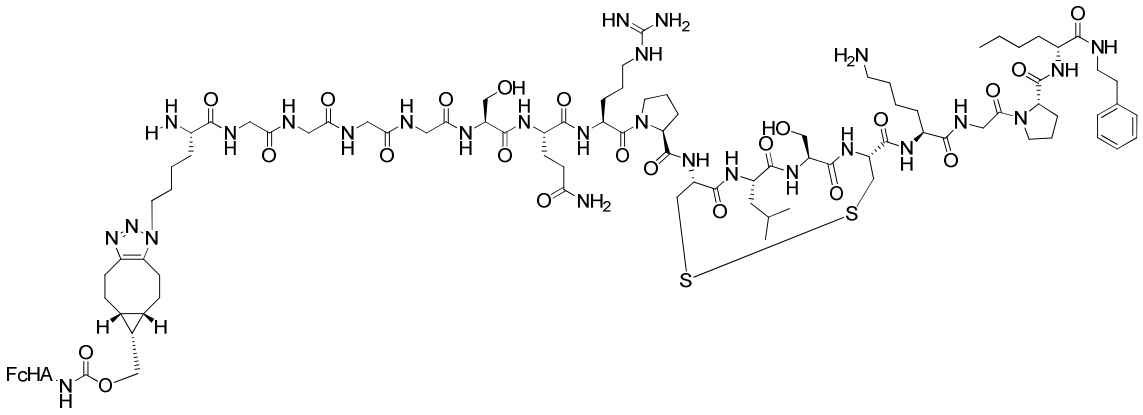


Fc-AH (del paso 1: 1 mL, 3 mg/mL, 0.117 µmol) se disolvió en 30 mM NaOAc pH 4.0 (4.3 mL) y una solución concentrada de 10mg/mL de (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (BCN) en DMSO (0.70 mL) se agregó lentamente y la reacción se colocó sobre agitador de placas a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió BCN (0,25 ml) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió BCN (0,70 ml) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución se intercambió en NaOAc a 30 mM pH 4,0 usando filtro de centrifugación MWCO Amicon de 10 kDa mediante la dilución y la concentración de la reacción 5 veces a un volumen de 900 µl. La solución se centrifugó y el sobrenadante se eliminó. Se midió mediante A280 que la concentración era de 1,73 mg / ml (1,56 mg, 26%). LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0.1%, 2-98% durante 2 min) R_t = 1.58 min.

Grado de Etiquetado	Calculado	Observado	% TIC (MS+) Intensidad
AH-Fc	51141	51141,5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31

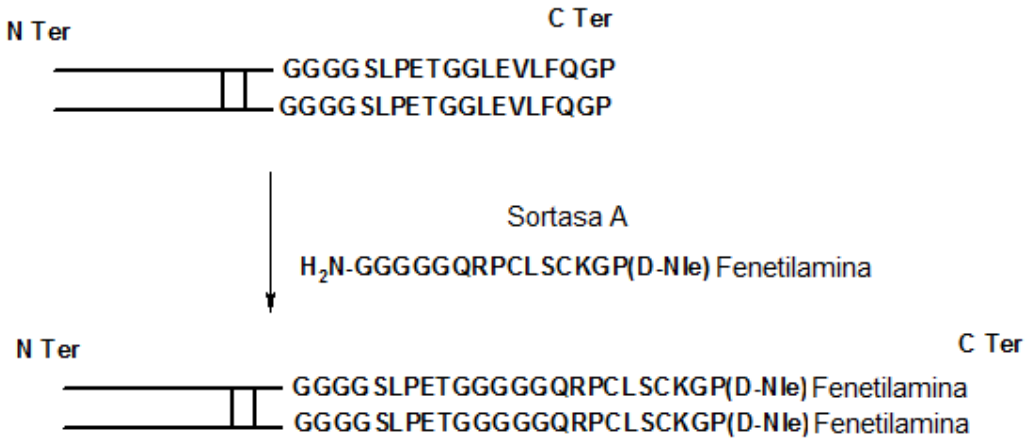
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

Paso 6: Preparación de ejemplo 42: Fc-HA-BCN conjugado a Intermediario 43c



Se preparó una solución concentrada de 50 mg / ml de **Intermediario 42c** en H_2O. Se añadió **Intermediario 43c** (53,7 µl, 1,515 µmol) a una solución concentrada de **Fc-HA-BCN (del paso 5)** en NaOAc a 30 mM pH 4.0 (1,73 mg / ml, 1,56 mg, 0,030 µmol) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución se intercambió en NaOAc a 30 mM pH 4,0 usando filtro de centrifugación MWCO Amicon de 50 kDa mediante la dilución y la concentración de la reacción 5 veces a un volumen de 250 µl. Se midió mediante A280 que la concentración era de 3,32 mg / ml (830 µg, 50%). LCMS (QT2, Protein_35-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0.1%, 10-80% durante 2 min) R_t = 1.43 min, MS [M(glicosilado)+H] 54524.5.

Ejemplo 43: Conjugado Fc-apelina usando Sortasa: (SEQ ID NOS 69, 69, 70, 71 y 71 respectivamente, en orden de aparición)



Paso 1: preparación de constructo de Fc-Sortasa:

Clonación de Constructo:

Un fragmento de ADN que contiene el péptido de señal de la cadena kappa de Ig de ratón seguido de un Fc humana y una secuencia de reconocimiento de sortasa (LPXTG) (SEQ ID NO: 72) fue optimizada en codones por síntesis de genes (GeneArt) con 5'-NheI y sitios de restricción de 3'-EcoRI. La secuencia resultante se digirió con restricción con NheI y EcoRI y se ligó en los sitios NheI y EcoRI de vector pPL1146, corriente abajo de un promotor de CMV. La ligación se transformó en células E. coli DH5α y colonias que contienen el inserto correcto se identificaron por secuenciación de ADN. La secuencia mostrada es para la cadena con sentido y corre en la dirección 5 'y 3'.

Fc-sortasa

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTG
GGTGCCAGGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCT
GAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC
TGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGA
GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGT

GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGAC
CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC
GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC
CCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACA
AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGGCG
GAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCCTAAGA
ATTC (SEQ ID NO: 73)

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGLEVLFQGP* (SEQ ID NO:74)

Expresión y Purificación de Proteínas:

ADN plásmido de expresión de Fc-sortasa se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1 x 10_6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) en matraz de 3 L durante 4 días a 37 ° C.

La proteína de Fc-sortasa se purificó a partir de medio condicionado clarificado. Brevemente, 500 ml de medio condicionado se hizo fluir a través de una columna HiTrap MabSelect SuRE de 5 ml (GE Life Sciences) a 4 ml / min. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-114 al 0,1% y luego la proteína de Fc-sortasa se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, neutralizado con Tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. Los rendimientos de proteína fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio acondicionado y los niveles de endotoxinas eran <1 EU/ mg, medidos por la prueba de Charles River ENDOSAFE PTS.

Control de Calidad de Proteínas de Fc-Sortasa:

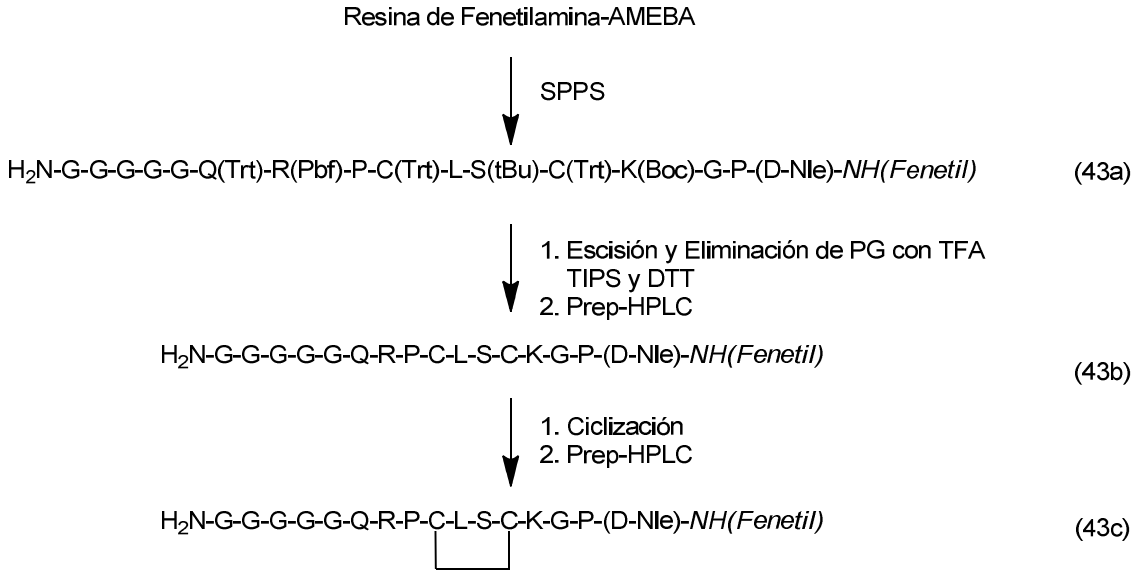
LC / MS de proteína de Fc-sortasa nativa: El pico fue heterogéneo y aproximadamente 3 kDa mayores a lo esperado para los dímeros. Esto es característico de glicosilación ligada a N esperada para Fc que tiene un sitio de glicosilación ligada a N de consenso.

LC / MS de proteína de Fc-sortasa reducida, N-deglicosilada: El pico era agudo. El peso molecular era menos de 2 daltones que el teórico, probablemente debido a la reducción de cisteína x2.

Exclusión por tamaño analítica en Superdex 200: Las proteínas de Fc-sortasa tienen entre 89 y 100% de dímero, 0 a 10% de tetrámero, y 0 a 1% de agregado.

SDS/PAGE de reducción: La proteína emigró predominantemente como un monómero del tamaño esperado.

Paso 2: Preparación de péptido de Apelina (H_2N-GGGGGQRPC*LSC*KGP (D-Nle)Fenetilamina) (SEQ ID NO: 70) para conjugación de Sortasa



(SEQ ID NOS 75, 70 y 70 respectivamente, en orden de aparición)

Paso 2a: Preparación de **Intermediario 43a**

Resina de fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,25 g, 0,25 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático

(CEM LIBERTY) con Arg doble estándar para residuos de Arg. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF.

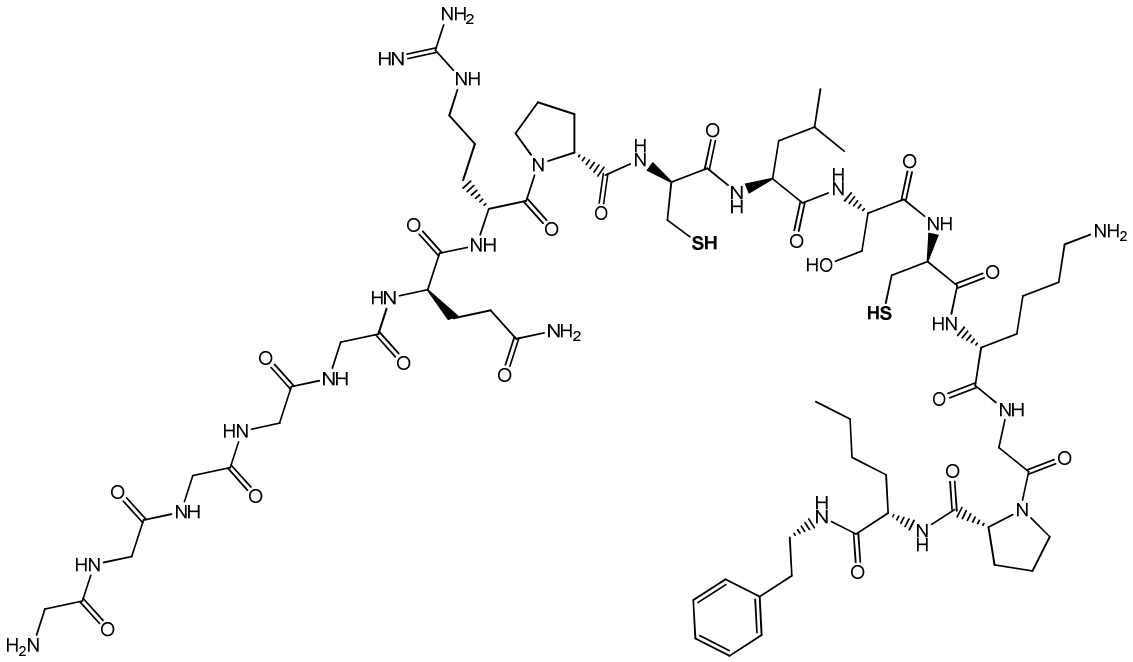
Un ciclo de acoplamiento se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (4,0 eq.), HATU (4,0 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 x 10 mL, 1 min cada vez).
- Desprotección Fmoc: Piperidina/DMF (1:4) (10 mL, 75 ° C durante 1 min luego 10 mL, 75 ° C durante 3 min).
- Lavado: DMF (4 x 10 mL, 1 min cada vez).

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Reacción Temperatura
1	Fmoc-D-Nle-OH	1x 5 min	75 ° C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 ° C
3	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 min	75 ° C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min a 25 ^{0}C 4 min a 50 ^{0}C
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 5 min	75 ° C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min	75 ° C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min a 25 ^{0}C 4 min a 50 ^{0}C
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 30 min	25 min a 25 ^{0}C 5 min a 75 ^{0}C
11	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 5 min	75 ° C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
13	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
14	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C

Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (3 x 10 ml), DCM (3 x 10 ml). La resina peptídica se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el **Intermediario 43a** (0,622 g, 0,25 mmol).

Paso 2b: Preparación del Intermediario 42b, H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (SEQ ID NO: 70)



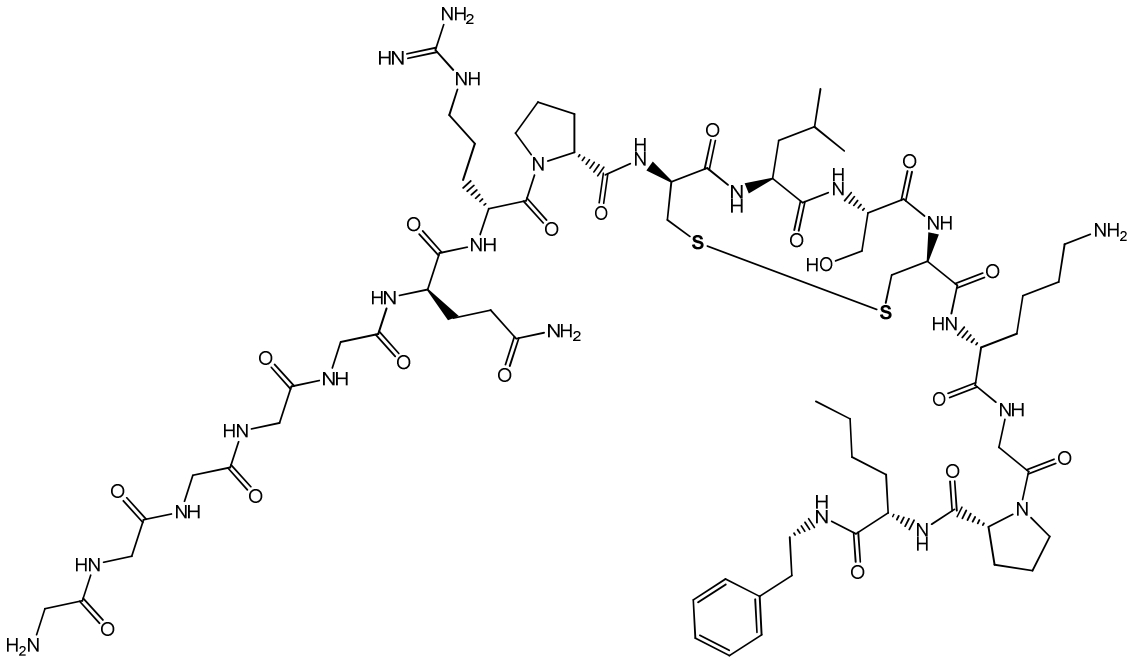
1) Escisión y eliminación del grupo protector

Al **intermedio43a** (0,622 g, 0,25 mmol) se añadió 3 ml de solución de 95% TFA/2.5% H_2O/TIPS al 2.5% y DTT (771 mg, 5,00 mmol), la mezcla resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se filtró. El filtrado se dejó caer en 40 ml de éter frío, después se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó con éter (3 x 40 ml), se agitó en vórtex y se centrifugó. El sólido se secó a alto vacío a 25 ° C durante 1 hora.

2) Purificación

A continuación, el sólido de color blanco anterior se purificó por HPLC preparativa (columna Sunfire$_{TM}$ Prep C18 OBD^{TM} 30x50mm 5 um de ACN/H2O W /TFA al 0,1% 75ml/min, ACN al 10-30% 8 min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar el **Intermediario 43b** como sal de TFA (44 mg, 11%).

Paso 3: Preparación de H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetil)* (C^9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70), **Intermediario 43c**



A **Intermediario 43b** (44 mg, 0,028 mmol) en 0,9 ml de H_2O se añadió I_2 (50 mM en AcOH, 1,1 ml 0,055 mmoles) por goteo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. LC / MS mostró la reacción completada. A la mezcla de reacción se le añadió varias gotas de 0,5 M de solución de ácido ascórbico (MeOH/H_2O = 1/1) hasta que el color de la solución se desapareció. La mezcla se diluyó con MeOH para purificación por HPLC. El sólido de color blanco anterior se purificó por HPLC preparativa (columna Sunfire$_{TM}$ Prep C18 OBD^{TM} 30x50mm 5 um de ACN/H_2O W /TFA al 0,1% 75ml/min, ACN al 10-30% 8

min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (C^9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70), **Intermediario 43c** como sal de TFA (13 mg, 30%). LC/MS (QT2, ProductAnalysis-HRMS-Acidic, Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 5,15 min): Tiempo de retención: 0,98 min; MS $[M+2]_{2+}$: observado: 1587.7993, calculado: 1587,868.

Paso 3: Conjugación de sortasa de Fc-Sortasa e Intermediario 43c

1) Conjugación de Sortasa Quimioenzimática

En baño de hielo, a la Fc-sortase (698 l, 0,040 mol, 3,15 mg / ml) en solución de búfer de PBS (pH 7,4) se añadió la solución de H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (C_9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70) (64,1 µl, 2,018 µmol, 50 mg / ml) en búfer de Tris-8.0, seguido de 520 µM de sortasa A (78 µl, 0,040 µmol) en 50 mM de Tris-Cl, pH 7,4, NaCl a 150 mM. La mezcla se sacudió a temperatura ambiente durante la noche. LC / MS mostró que la reacción se completó.

2) Purificación y desalinazión

La solución anterior se hizo fluir a través de una columna HiTrap Mab Select SuRe de 5 ml (GE Lifesciences # 11-0034-95) en 4mL/min en ATTA XPRESS. Ejemplo 43 se lavó en la columna con 20 volúmenes de columna (CV) PBS + Triton 114 al 0,1% y se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, se neutralizó con tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. La solución purificada se desaló usando una columna de desalinización Zeba Sping, 5 ml (89891) para proporcionar 1,5 ml de solución objetivo, la concentración media fue de 0,598 mg / ml, y la recuperación fue de 90%. LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, AcQuity ProSwift RP-3U 4.6 x 50 mm, 1.0 mL/min, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 3 min): R_t = 1.55 minutos, MS [M+H] 58845.0000.

Secuencia del Ejemplo 43:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT

51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 76)

en donde LSLSPGK*GGG GSLPETGGGGG* (SEQ ID NO: 77) representa el enlazador y *QRPC*LSC*KGP(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 78) *el polipéptido.*

Se ha encontrado que el polipéptido en los ejemplos a continuación tienen valores EC_{50} en el rango de 0.01 nM a 1100 nM aproximadamente para potencia del receptor APJ. Se ha encontrado que los polipéptidos en los ejemplos a continuación tienen una estabilidad de plasma mayor de 2 minutos, mayor de 5 minutos, mayor de 10 minutos, mayor de 20 minutos, mayor de 50 minutos y mayor de 60 minutos.

Se puede ver que los polipéptidos de la invención son útiles como agonistas del receptor APJ y por lo tanto son útiles en el tratamiento de enfermedades y condiciones sensibles a la activación del receptor APJ, tal como las enfermedades divulgadas en la presente.

Además, la vida media de estos péptidos se puede ampliar aún más mediante la formación de un bioconjugado que comprende un péptido o polipéptido según una cualquiera de la Fórmula I a IV con un fracción de extensión de vida media, tales como albúmina de suero humano o un dominio Fc.

Habiendo descrito así las realizaciones de ejemplo de la presente invención, se debe notar por los expertos en la técnica, que las divulgaciones son de ejemplo solamente y que varias otras alternativas, adaptaciones, y modificaciones pueden realizarse dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a realizaciones específicas como se ilustra en la presente.

REIVINDICACIONES:

1. Un polipéptido cíclico que tiene la siguiente fórmula I (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está, bien sea ausente, Q, A o PE o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es un aminoácido que contiene azufre seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y, y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

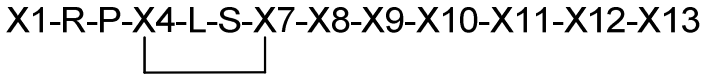
D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

2. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula II (SEQ ID NO: 2):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido, y está ausente o se selecciona a partir de Q, A y pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

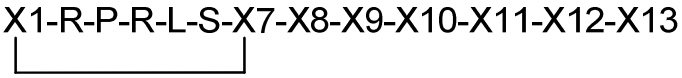
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle, Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y, y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



III

en donde

X1 es el extremo N del polipéptido y se selecciona a partir de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X1;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

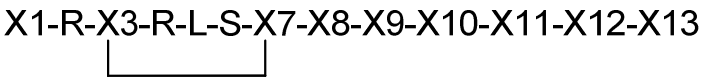
X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me)F, F, f, a, y, y Nal;

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

4. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula IV (SEQ ID NO: 5):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y, es bien sea, ausente, Q, A o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;
X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y, y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 en donde X1 es pE; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

6. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 en donde X1 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido.

7. El polipéptido según las reivindicaciones 1 a 4 y 6 en donde el extremo N es una amida; o una sal del polipéptido.

8. El polipéptido según la reivindicación 7 en donde el extremo N es una amida de la Fórmula –NHR y R es acetilo, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$C(O)-, o Ph-CH_2CH_2NHC(O)-; o una sal del polipéptido.

9. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde X13 es F o f; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

10. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde X13 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido

11. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a-10 en donde X12 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido

12. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el extremo C es una amida; o una sal del polipéptido.

13. El polipéptido según la reivindicación 12 en donde el extremo 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.

14. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en donde X8 es K; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

15. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en donde X9 es G; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

16. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en donde X10 es P; o una amida, un éster o una sal del polipéptido

17. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en donde X11 es Nle o D-Nle; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

18. El polipéptido según la reivindicación 1 seleccionado a partir de (SEQ ID NOS 19-57, respectvamente, en orden de aparición):

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(fenetilo)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH_2
*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

en donde los dos aminoácidos rotulados con "*" representan los aminoácidos que forman un disulfuro; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

19. Un bioconjugado o multímero del mismo que comprende:

a. un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una amida, un éster o una sal del mismo, y

b. una fracción de extensión de vida media;

en donde dicho péptido o polipéptido y fracción de extensión de vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

20. El bioconjugado o un mutimero del mismo, de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo o una albúmina de suero humano.

21. El bioconjugado según las reivindicaciones 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es un fragmento Fc FcLALA-modificado con una mutación LALA (L234A, L235A).

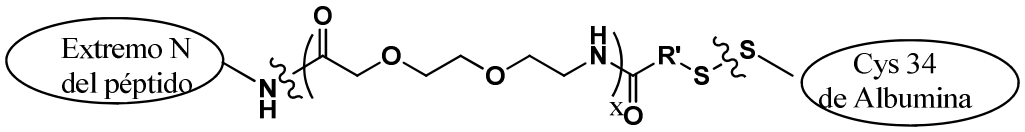
22. El bioconjugado de acuerdo con la reivindicación 21 en donde la fraccion de extensión de vida media es un dominio Fc que se fusiona a un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV a través de un enlazador y en donde el enlazador tiene la siguiente fórmula:
- [GGGGS]n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 7) o el enlazador es GS o GG, y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural.

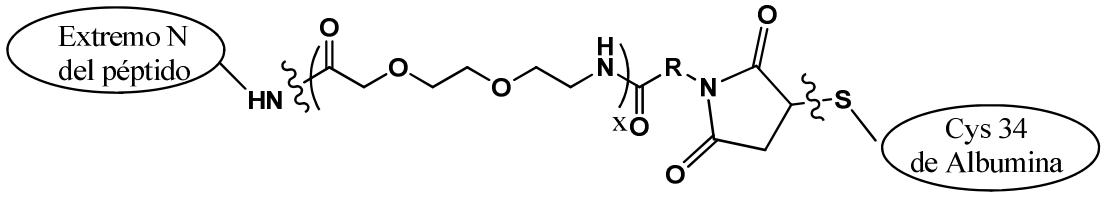
23. El bioconjugado según la reivindicación 22 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I que se selecciona entre QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 10), en donde los dos aminoácidos marcados con "*" representan los aminoácidos que forman un disulfuro o enlace de amida a través de su cadena lateral.

24. El bioconjugado según la reivindicación 22 o 23 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina.

25. El bioconjugado o multímero del mismo de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 en el que la fracción de extensión de vida media es albúmina sérica humana.

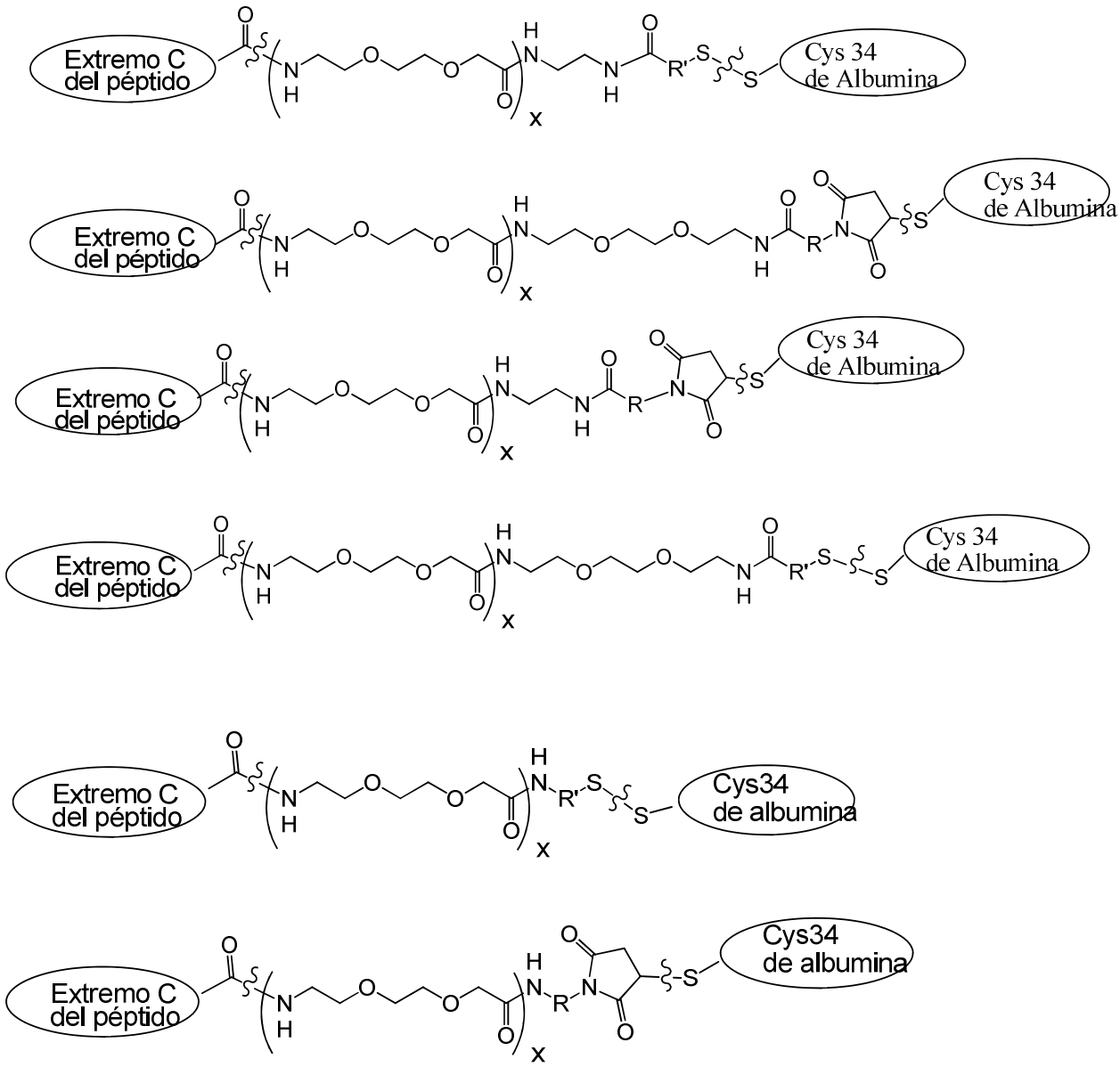
26. El bioconjugado según la reivindicación 25 en donde la albúmina sérica humana está químicamente ligada al extremo N-terminal de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:





en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

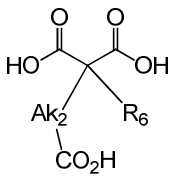
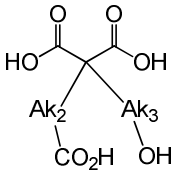
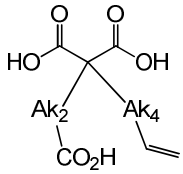
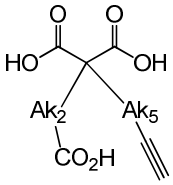
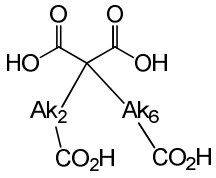
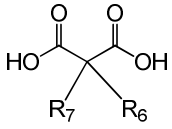
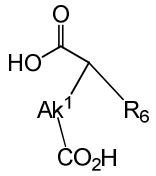
27. El bioconjugado según la reivindicación 19 o 20 en donde la albúmina sérica humana está químicamente ligada al extremo C-terminal de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:



en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

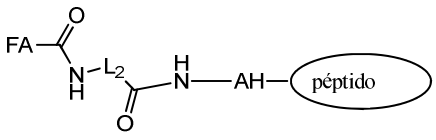
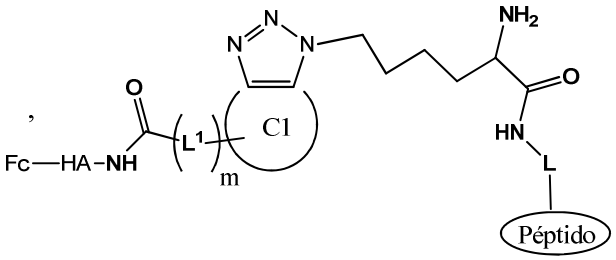
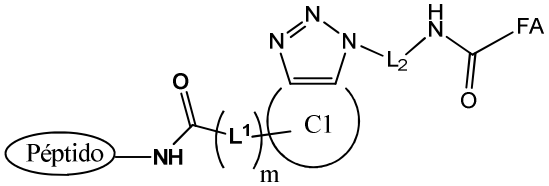
28. El bioconjugado según la reivindicación 19 en donde la fracción de extensión de vida media es un ácido graso.

29. El bioconjugado según la reivindicación 28 en donde el ácido graso se selecciona de:







y


en donde Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 y Ak^6 son independientemente un (C_{8-20})alquileno, R^6 y R^7 son independientemente alquilo(C_{8-20}).

30. El bioconjugado según la reivindicación 19, 28 o 29 que tiene la siguiente fórmula:

o


(SEQ ID NO: 11)

en donde el péptido es el extremo N-terminal del péptido, n es 1, 2 o 3, m es 0 o 1, A es alanina, H es histidina, L2 es un enlazador, C1 es un sistema de anillo mono, di-, o tricíclico carboxílico o heterocíclico opcionalmente sustituido por flúor y L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en donde la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= O), y en donde uno o mas carbonos se sustituye por O o NH.

31. Un método de tratar o prevenir una enfermedad o trastorno sensible al agonismo del receptor APJ, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

32. El método de la reivindicación 31 en donde la enfermedad o trastorno se selecciona a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

33. Un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para uso como un medicamento.

34. Un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno sensible al agonismo del receptor APJ.

35. Un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 o para utilizar en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis

lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

36. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, y uno o más co-agentes terapéuticamente activos.

37. Una combinación según la reivindicación 36 en donde el co-agente se selecciona a partir de inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-Co-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de aldosterona, bloqueadores de receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y/o un inhibidor de NEP.

38. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
55418-WO-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2014/047377	21 July 2014 (21-07-2014)	25 July 2013 (25-07-2013)
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 3 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/US2014/047377

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)

   [X] 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/US2014/047377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 A61K38/17 A61P9/04
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)
C07K A61K

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, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIDOROVA M V ET AL: "Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogues", RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY, M A I K NAUKA - INTERPERIODICA, RU, vol. 38, no. 1, 28 January 2012 (2012-01-28), pages 40-51, XP002706051, ISSN: 1068-1620, DOI: 10.1134/S1068162012010177 page 31, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 5; table 1 -----	1-38

☐ 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
14 November 2014	25/11/2014

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	Fuhr, Christian

1

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2014/047377

Alexandra Marshall BRUCE
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Philipp GROSCHE
Novartis Pharma AG
Postfach
CH-4002 Basel
Suiza
Nacionalidad: Alemán

Carla GUIMARAES
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Portugues

Aaron KANTER
20 Brastow Ave.
Somerville,
Massachusetts 02143
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Changgang LOU
3681 Fawn Cove Lane,
Apt. 1 Portage,
Michigan 49024
Estados Unidos
Nacionalidad: China

Aimee Richardson USERA
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Kayo YASOSHIMA
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Japones

Jun YUAN
400 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Frederic ZECRI
100 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Frances

Hongjuan ZHAO
250 Technology Square
Cambridge,
Massachusetts 02139
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

POLIPÉPTIDOS CÍCLICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado de manera electrónica en formato ASCII y se incorpora en la presente en su totalidad como referencia. Dicha copia ASCII, creada el 29 de septiembre de 2014, se denomina PAT055418-WO-PCT_SL.txt y tiene 49,524 bytes de tamaño.

LISTADO DE SECUENCIAS

La invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden secuencias de péptidos y polipéptidos modificadas diseñadas para tratar la enfermedad cardiovascular en sujetos a los que se administran, y que presentan una mayor resistencia a la degradación, y con una bioactividad equivalente o mayor que sus homólogos de tipo silvestre. La invención también se refiere a métodos para preparar dichas composiciones y el uso de dichas composiciones como agentes farmacéuticamente activos para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

FUDAMENTO DE LA INVENCIÓN

La incidencia de falla cardiaca en el mundo occidental es aproximadamente 1/100 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, con ello, el gasto cardíaco, es decir, el volumen efectivo de sangre expulsado por cualquier ventrículo del corazón con el tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, insuficiencia del corazón para mantener la circulación sanguínea adecuada, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más. Hay aproximadamente unas quinientas mil hospitalizaciones al año por "insuficiencia cardiaca aguda descompensada" (ICAD), sólo en los EE.UU.

Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos, vasodilatadores e inotrópicos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Los inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendan) se utilizan en el contexto agudo, a pesar de

su asociación con eventos adversos como arritmias y aumento de la mortalidad a largo plazo. Estos compromisos han impedido su aplicación en la insuficiencia cardíaca crónica. La digoxina es un fármaco inotrópico oral, pero está limitado por un estrecho margen terapéutico, potencial arritmogénico aumentado y contraindicaciones en caso de insuficiencia renal.

Se necesita con urgencia una terapia para la insuficiencia cardíaca, que aumente la contractilidad cardíaca sin compromisos arritmogénicos o de mortalidad para ICAD, pero que también pueda hacer frente a la enorme necesidad médica no satisfecha en insuficiencia cardíaca crónica.

Apelina es el ligando endógeno del anteriormente receptor huérfano acoplado a proteína G (GPCR), APJ, también conocido como receptor de apelina, receptor de angiotensina similar al tipo 1, receptor de angiotensina similar al tipo 2 y similares. La ruta de apelina/APJ se expresa ampliamente en el sistema cardiovascular y la apelina ha mostrado importantes efectos cardiovasculares beneficiosos en los modelos preclínicos. La administración de apelina aguda en los humanos provoca la vasodilatación periférica y coronaria y aumenta el gasto cardíaco (Circulation.2010; 121:1818-1827). Como un resultado, el agonismo de APJ está emergiendo como una importante diana terapéutica para los pacientes con insuficiencia cardíaca. La activación del receptor de apelina APJ se cree que aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona cardioprotección, sin los compromisos de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben una vida media y duración de acción muy cortas in vivo. La vida media muy corta es una de las principales dificultades reconocidas con la entrega de dichos péptidos endógenos terapéuticos debido a rápida eliminación del suero y degradación proteolítica a través de la acción de peptidasas.

Una forma que se ha utilizado en la actualidad para superar esta desventaja es administrar al paciente grandes dosis del péptido terapéutico de interés, de modo que si incluso algún péptido terapéutico se degradara, quedara suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Sin embargo, este método es incómodo para los pacientes. Como la mayoría de los péptidos terapéuticos no se pueden administrar por vía oral, el péptido terapéutico tendría que ser, bien sea constantemente infundido, infundido con frecuencia por inyección intravenosa o administrado con frecuencia por la ruta inconveniente de inyecciones subcutáneas. La necesidad de una administración frecuente también resulta en muchos terapéuticos peptídicos potenciales con un costo previsto de tratamiento inaceptablemente elevado. La presencia de

grandes cantidades de péptido degradado también puede generar efectos secundarios no deseados.

Malestar en la administración y los altos costos son dos razones por las cuales la mayoría de los péptidos terapéuticos con perfiles de bioactividad atractivos no pueden ser desarrollados como fármacos candidatos.

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

Por tanto, es deseable identificar péptidos y polipéptidos que imiten la función de apelina, pero han aumentado la vida media y demuestren bioactividad equivalente o mayor que la apelina de origen natural. Además, es deseable identificar péptidos y polipéptidos análogos de apelina que presenten aumento de restricciones conformacionales, es decir, la capacidad de alcanzar y mantener un estado conformacional activo de tal manera que los péptidos y polipéptidos puedan interactuar con sus receptores y/o otros objetivos de la vía sin necesidad de plegado o reposicionamiento adicional. Otros enfoques incluyen la reducción de la tasa de eliminación mediante la conjugación de los péptidos con moléculas que impiden su eliminación a través del riñón.

Hay así una necesidad de péptidos terapéuticos modificados con una mayor vida media con el fin de proporcionar una mayor duración de acción in vivo, manteniendo al mismo tiempo una baja toxicidad pero conservando las ventajas terapéuticas de los péptidos modificados.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN:

Esta invención está dirigida a superar el problema de la degradación del péptido en el cuerpo mediante la modificación del péptido terapéutico o polipéptido de interés, es decir, agonistas de APJ.

El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos péptidos y polipéptidos o bioconjugados de los mismos, que son útiles como agonistas de APJ, y que también poseen al menos una de las siguientes mejoras sobre la apelina tipo silvestre y otros análogos de apelina conocidos: vida media aumentada; mayor inmunidad a la degradación después de la administración y/o ante una solubilización; y aumento de restricciones conformacionales, todo mientras se exhibe la misma o mayor actividad biológica que la de apelina tipo silvestre. Los

péptidos y polipéptidos de esta invención, o bioconjugados de los mismos, son por lo tanto particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca, trastornos y afecciones asociadas con insuficiencia cardíaca, y trastornos y afecciones que responden a la activación de la actividad del receptor APJ.

En una realización, los péptidos y polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de un trastorno o afección asociada con la insuficiencia cardíaca, o un trastorno sensible a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor APJ . En otra realización, los peptidos y polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

La invención se refiere a los péptidos y polipéptidos, o bioconjugados de los mismos, composiciones farmacéuticas, y métodos de fabricación y uso de los mismos, como se describe en el presente documento. Ejemplos de péptidos y polipéptidos de la invención incluyen los péptidos y polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, así como cualquiera de los péptidos o polipéptidos enumerados específicamente en este documento, y bioconjugados de los mismos, incluyendo pero no limitado a los ejemplos experimentales.

Por consiguiente, la invención proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I), (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea, ausente o es Q, A o PE, o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es aminoácido que contiene azufre seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, HhC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

Como se explicó adicionalmente en la presente, las abreviaturas de tres letras o una letra reconocidas en la técnica se utilizan para representar residuos aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. ~~A menos que esté precedido por una "D", el aminoácido es un L aminoácido~~. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, ésta se refiere al aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, ésta se refiere al aminoácido D Alternavamente, un aminoácido D se puede representar con una letra D al comienzo de la abreviación, por ejemplo, cuando esta preceiddo por una "D", el aminoácido esn un aminoácido D.

Cualquiera de los residuos aminoácidos listados anteriormente de la Fórmula I, o sus fórmulas relacionadas descritas en la presente, ej., Fórmulas I a IV, pueden sustituirse de manera conservadora, siempre que el péptido o polipéptido de la invención retenga la actividad funcional y propiedades estructurales (ej., extensión de vida media, protección contra degradación, restricción conformacional). Principios y ejemplos de sustituciones conservadoras y permisibles de aminoácidos se explican adicionalmente en la presente.

La invención proporciona además un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende:

a. un péptido o un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV,
b. Una fracción de extensión de vida media;

en el que dicho péptido o polipéptido y dicha vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

"Opcionalmente a través de un enlazador" significa que el péptido del polpéptido de acuerdo con las fórmulas I-IV esta covalentemente unido o fusionado directamente al grupo que extiende la vida media (por ejemplo, sin un enlazador) o está covalentemente unido o fusionado directamente al grupo que extiende la vida media a través de un enlazador.

La fracción de extensión de vida media de la invención puede ser covalentemente fusionado, unido, ligado o conjugado con un péptido o análogo de polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; un ácido graso o cualquier

proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un residuo de unión a albúmina. Un "residuo de unión a albúmina" como se usa aquí significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina de suero humano. En una realización, el residuo de unión a albúmina es un residuo lipofílico. En otra realización, el residuo de unión a albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico. Un residuo de unión a albúmina comprende típicamente un ácido carboxílico que puede ser cargado negativamente. Ejemplos de residuos de unión a albúmina incluyen ácidos grasos. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptidos de unión a albúmina o residuos tales como por ejemplo un ácido graso. Preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una albúmina de suero humano o una región Fc. Lo más preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una región Fc.

La fracción de extensión de vida media está unido de tal manera con el fin de mejorar, y/o no interferir con, la función biológica de las partes constituyentes de los bio-conjugados de la invención, por ejemplo, el péptido o polipéptido de la invención (Fórmulas I-IV). En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención puede fusionarse a una fracción de extensión de vida media, opcionalmente a través de un enlazador. La fracción de extensión de vida media puede ser una proteína tal como un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o polipéptidos o residuo (por ejemplo, un ácido graso) de unión a albúmina. Tales proteínas descritas en este documento también pueden formar multímeros.

En algunas realizaciones, la fracción de extensión de vida media (por ejemplo, HSA, Fc, ácidos grasos, etc) se une covalentemente o fusiona con el extremo N del péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I-IV. En otras realizaciones, la fracción de extensión de vida media (por ejemplo, HSA, Fc, ácidos grasos, etc) está covalentemente unida

o fusionada al extremo C del péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV de la invención.

Los polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

En una forma de realización preferida, los polipéptidos de la invención, o bioconjugados de los mismos, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD).

En otra realización, la invención se refiere a un método de tratar un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en un sujeto en necesidad de tal tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de tal manera que se trate el trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ en el sujeto.

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

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

En otra realización, la invención se refiere a un método para la activación del receptor APJ en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende: administrar al sujeto una cantidad

terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para propósitos de interpretar esta especificación, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se especifique lo contrario y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural y viceversa.

Como se usa aquí, "trastornos o enfermedades que responden a la modulación del receptor APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de APJ", "trastornos y afecciones que responden a la modulación de la actividad del receptor APJ", "trastornos sensibles a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor APJ, "y términos similares incluyen la insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

Como se usa aquí, "Activación de la actividad del receptor APJ," o "activación del receptor APJ," se refiere a un aumento en la actividad del receptor APJ. La activación de la actividad del receptor APJ también es referido como "agonismo" del receptor APJ, por ejemplo, mediante la administración de los péptidos y polipéptidos de la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Excepto para las abreviaturas para los aminoácidos poco comunes o no naturales expuestos en la Tabla 1 a continuación, las abreviaturas de tres letras o una letra reconocidas en la técnica se utilizan para representar los residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por “D,” el aminoácido es un aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayuscula, ésta se refiere al aminoácido D. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minuscula, ésta se refiere al aminoácido L. Los grupos o cadenas o abreviaturas de aminoácidos se utilizan para representar los péptidos. Los

péptidos se indican con el extremo N en la izquierda y la secuencia se escriben desde el extremo N al extremo C.

Los péptidos de la invención contienen aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza) y otros análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica puede emplearse alternativamente.

Ciertos aminoácidos no naturales pueden introducirse por la tecnología descrita en Deiters, J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301:964-967, 2003; Wang , Science 292: 498-500, 2001; Zhang, Science 303:371-373, 2004 o en la Patente EE.UU. No. En pocas palabras, algunos de estos sistemas de expresión implican la mutagénesis dirigida a sitio para introducir un codón sin sentido, como lo es codón TAG ámbar, en el marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de la invención. Dichos vectores de expresión luego se introducen en un huésped que puede utilizar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y cargado con el aminoácido no natural de elección. Aminoácidos no naturales particulares que son beneficiosos para el propósito de conjugar fracciones con los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con acetileno y cadenas laterales de azido.

Uno o más de los aminoácidos naturales o no naturales en un péptido de la invención se pueden modificar, por ejemplo, por 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, un enlazador para la conjugación, funcionalización, u otra modificación, etc. Dichas modificaciones se pueden hacer de una manera específica a sitio o no específica a sitio. En una realización preferida, las modificaciones del péptido llevan a un péptido más estable (por ejemplo, uno que presenta una mayor vida media in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la incorporación de aminoácidos D adicionales, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido, pero tales modificaciones pueden conferir propiedades deseables, por ejemplo, actividad biológica mejorada, en el péptido.

Dichas modificaciones mejoran las propiedades biológicas de las proteínas de la invención en relación con las proteínas tipo silvestre, así como, en algunos casos, sirven como puntos de fijación para, por ejemplo, las etiquetas y los agentes de extensión de vida media proteica, y para fines de fijar dichos variantes a la superficie de un soporte sólido.

En ciertas realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo modificaciones específicas a sitio, se utilizan para fijar conjugados, ej., grupos PEG a polipéptidos, y/o péptidos de la invención, para fines de por ejemplo, extender la vida media o de otra manera mejorar las propiedades biológicas de dichos polipéptidos, y/o péptidos. Dichas técnicas se describen adicionalmente en la presente.

En otras realizaciones, tales modificaciones, ej., las modificaciones específicas a sitio, se utilizan para fijar otros polímeros y moléculas pequeñas y secuencias de proteínas recombinantes que extienden la vida media del polipéptido de la invención. Tal realización incluye la fijación de ácidos grasos o compuestos específicos de fijación de albúmina a polipéptidos, y/o péptidos. En otras realizaciones, las modificaciones se hacen en un tipo de aminoácido particular y pueden fijarse en uno o más sitios sobre los polipéptidos.

En otras realizaciones, tales modificaciones, por ejemplo, modificaciones específicas a sitio se utilizan como elementos de fijación para la producción de multímeros de tipo silvestre y/o variantes, por ejemplo, dímeros (homodímeros o heterodímeros) o trímeros o tetradímeros.. Estas moléculas de proteínas multiméricas, pueden además tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colésterol fijados o a ser fusionados ya sea de manera amino-terminal o carboxi-terminal con otras proteínas, tales como Fc, Albúmina de Suero Humano (HSA), etc.

En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para producir proteínas, polipéptidos y/o péptidos en donde la posición de la pirrolisina o análogo de pirrolisina específicamente incorporada a sitio o aminoácidos de origen no natural (para-acetil-Phe, para-azido-Phe) permite la orientación controlada y fijación de tales proteínas, polipéptidos y/o péptidos sobre una superficie de un soporte sólido o tener grupos tales como PEG, azúcares y/o conjugados PEG-colésterol fijados.

En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando así hetero-oligómeros incluyendo pero sin limitar a heterodímeros y heterotrímeros. En otras realizaciones, tales modificaciones específicas a sitio se utilizan para entrecruzar específicamente a sitio proteínas, polipéptidos y/o péptidos formando conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido, conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido. En otras realizaciones, una modificación específica a sitio puede incluir una punto de

ramificación para permitir que más de un tipo de molécula sea fijada en un único sitio de una proteína, polipéptido o péptido.

En otras realizaciones, las modificaciones listadas en la presente pueden realizarse en una forma no específica a sitio y resultar en conjugados proteína-proteína, conjugados proteína-polipéptido, conjugados proteína-péptido, conjugados polipéptido-polipéptido, conjugados polipéptido-péptido o conjugados péptido-péptido de la invención.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona complejos que comprenden al menos un péptido o polipéptido de una cualquiera de las Fórmulas I-IV unido a un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une específicamente a un péptido o polipéptido como se describe aquí.

Un experto normal en la técnica apreciará que varias sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras, pueden hacerse en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento, sin necesariamente disminuir su actividad. Como se usa en este documento, "aminoácido comúnmente usado como un sustituto del mismo" incluye sustituciones conservadoras (es decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). A efectos de sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrófobos) 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 cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (acídicos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido L por su aminoácido D correspondiente, la sustitución de cisteína por homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene tiol, la sustitución de una lisina por homolisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, ornitina u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene amino, o la sustitución de una alanina por norvalina o similares.

El término "aminoácido", como se utiliza en la presente, se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales, todos en sus éstereoisómeros D y L, si su estructura permite tales formas éstereoisoméricas. Los aminoácidos se denominan en adelante ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras

comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímicos IUPAC-IUB.

El término “de origen natural” se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por el hombre. Del mismo modo, "no natural" como se utiliza en la presente se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o ha sido sintetizado por el hombre. Cuando se utiliza en conexión con aminoácidos, el término “de origen natural” se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A o Ala), cisteina (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), triptofano (W o Trp), y tirosina (Y o Tyr)).

Los términos "aminoácido no natural" y “aminoácido innatural” como se utilizan en la presente para representar las estructuras de aminoácidos que no se pueden generar biosintéticamente en cualquier organismo usando genes sin modificar o modificados a partir de cualquier organismo, ya sea el mismo o diferente. Los términos se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia proteica de Adelina de origen natural (tipo silvestre) o las secuencias de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos naturales, selenocisteína, pirrolisina (PYL), o pirrolina-carboxi-lisina (PCL, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente PCT WO2010/48582). Tales residuos aminoácidos no naturales pueden introducirse por la sustitución de aminoácidos de origen natural y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia proteica Apelina natural (tipo silvestre) o las secuencias de la invención. El residuo aminoácido no natural también puede incorporarse de tal manera que una funcionalidad deseada se imparte a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad para enlazar una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se utiliza en conexión con aminoácidos, el símbolo “U” significa “aminoácido no natural” y aminoácido innatural,” como se utiliza en la presente.

Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt modificada (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" pares son generados por un proceso de selección desarrollado por Schultz o por mutación aleatoria o específica. A manera de

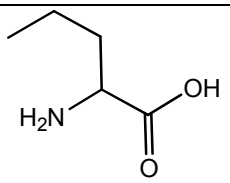
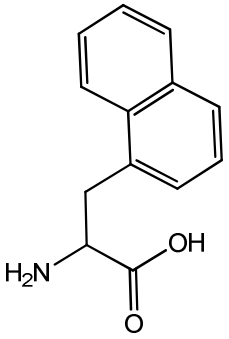
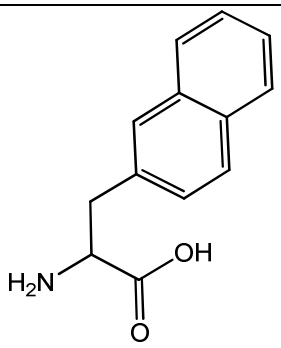
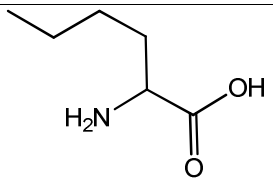
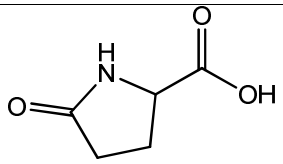
ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un “aminoácido natural” generado biosintéticamente por genes transferidos desde un organismo en las células huésped e incorporado en proteínas utilizando genes de sintetasa de ARNt natural y ARNt, mientras *p*-aminofenillalanina (Ver, Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9) es un “aminoácido no natural” puesto que, aaunque se genera biosintéticamente, se incorpora en las proteínas por un par tRNA/tRNA sintetasa ortogonal “seleccionado”.

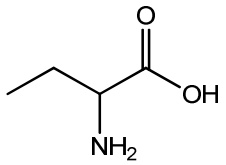
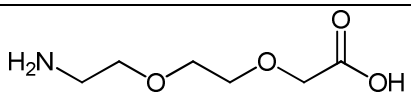
Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidinacarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-amino-butírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butil*g*licina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, 2,2 '-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropriónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipecólico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye aminoácidos naturales que son metabolitos de ciertos organismos, pero no están codificados por el código genético para su incorporación en las proteínas. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

El término “análogo aminoácido,” como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a manera de ejemplo solamente, un carbono-α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R Análogos aminoácidos incluyen los aminoácidos naturales y no naturales que son químicamente bloqueados, de manera reversible o irreversible, o su grupo carboxi C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral son químicamente modificados. Tales análogos incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, S-(carboximetil)-cisteína, S-(carboximetil)-cisteína sulfóxido, S-(carboximetil)-cisteína sulfona, ácido aspártico-(beta-

éster metílico), N-etilglicina, carboxamida de alanina, homoserina, norleucina, y metionina metil-sulfonio.

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

Símbolo	Nombre	Estructura
Nva o nva (D-Nva)	L-Norvalina o D-Norvalina	
1-Nal	1-Naftilalanina	
2-Nal	2-Naftilalanina	
Nle o nle (D-Nle)	L-Norleucina o D-Norleucina	
pE	Ácido piroglutámico	

Abu o abu (D-Abu)	Ácido 2-amino-butírico	
O2Oc	Ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico	

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

Como se utiliza en la presente, el término “amida” se refiere a un derivado de amida del grupo de ácido carboxílico en el extremo C (ej.-$C(O)NH_2$,-$C(O)NH$-C_{1-6} alquilo,-$C(O)NH$-C_{1-2}alquilfenilo,-C(O)NH-NHBn o-C(O)-4 fenoxipiperidina o –$C(O)N(C_{1-6}$ alquilo$)_2$).

El término “amida” también se refiere a derivados del grupo amino en el extremo N (ej.,-$NHC(O)C_{1-16}$alquilo,-$NHC(O)(CH_2)_n$Ph (n es un entero de 1 a 6),-$NHC(O)(CH_2)_2CO_2H$, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)NH$-, $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-, $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-; $C_{15}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)NH-, Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-NH- o $CH_3(OCH_2CH_2)_mC(O)NH$- (m es un entero de 1 a 12).

Como se utiliza en la presente, el término “éster” se refiere a un derivado éster del grupo de ácido carboxílico en la forma del extremo C (ej.,-COOR) en donde R del éster se refiere a grupos C_{1-6} alquilo tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc., grupos C_{3-8} cicloalquilo tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos C_{6-10} arilo tales como fenilo, α-naftilo, etc., grupos C_{6-10} aril-C_{1-6} alquilo, por ejemplo grupos fenil-C_{1-2} alquilo tales como bencilo, fenetilo, benzhidrilo, etc., y grupos α-naftil-C_{1-2} alquilo tales como α-naftilmetilo y similares. Se puede hacer mención de éster de pivaloiloximetilo y similares, los cuales comúnmente se utilizan como ésteres para administración oral. Cuando los polipéptidos de la invención poseen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en posiciones diferentes del extremo C, estos polipéptidos en los cuales tales grupos son amidados o ésterificados también están en la categoría del polipéptido de la invención. En tales casos, los

ésteres pueden por ejemplo ser las mismas clases de ésteres que los ésteres C-terminales mencionados anteriormente.

El término alquilo se refiere a una fracción de hidrocarburo ramificada o no ramificada completamente saturada (o cadena lineal), que comprende 1 a 20 átomos de carbono. Preferiblemente, el alquilo comprende 1 a 7 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono.

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

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

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

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

El término "APJ" (también conocido como "receptor de apelina", "receptor de angiotensina-tipo-1", "receptor de angiotensina II-tipo-1", y similares) indica un dominio 7

transmembrana de 380 residuos, receptor acoplado a *Gi* cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en humanos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_005152.1, y codificado por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_005161). APJ primero se clonó en 1993 a partir de ADN humano genómico utilizando cebadores de oligonucleotidos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor de angiotensina II tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina II no se une a APJ. Aunque huérfano desde hace muchos años, el ligando endógeno ha sido aislado y nombrado apelina (Tatemoto et aI., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

El término "apelina", indica una preproteına de 77 residuos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_0059109.3, y codificado por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_017413.3), la cual se transforma en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de longitud completa, denominado "apelina-36," comprende 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13mer de apelina (apelina-13), conocido como "Pyr-1-apelina-13 o Pyr^{1}-apelina-13. Diferentes formas de apelina "se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.492.324 B1.

El término "conjugado" y "bioconjugado" se utiliza indistintamente y pretende referirse a la entidad formada como resultado de una unión covalente entre un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV, y una fracción de extensión de vida media, opcionalmente a través de un enlazador . El término "conjugado" o "bioconjugado" también pretende incluir una entidad formada como resultado de una fusión entre un polipéptido agonista de APJ o un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV, y una fracción de extensión de vida media.

La fracción de extensión de vida media puede ser covalentemente unido/ligado o fusionado con un análogo de péptido o polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), ácido graso, un grupo de colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. En otra realización, la fracción de extensión de vida media es un residuo de unión a albúmina. Un "residuo de unión a albúmina" como se usa aquí significa un residuo que se une no covalentemente a la albúmina de suero humano. En una realización, el residuo de unión a albúmina es un residuo lipofílico. En otra

realización, el residuo de unión a albúmina está cargado negativamente a pH fisiológico. Un residuo de unión a albúmina comprende típicamente un ácido carboxílico que puede ser cargado negativamente. Ejemplos de residuos de unión a albúmina incluyen ácidos grasos. En otra realización, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. Por ejemplo, la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptido de unión a albúmina o residuos tales como por ejemplo un ácido graso. Lo más preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una región Fc.

El término "vida media aumentada" o "vida media sérica aumentada" o "extender lvida media" se entiende el cambio positivo en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada (por ejemplo apelina 13) en relación con su forma no-modificada (o forma desnuda del péptido). La vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa, y la determinación de la concentración esa molécula en cada muestra. Medir el cambio en la concentración en suero con el tiempo permite el cálculo de la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo, molécula conjugada). Mediante comparación, la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo molécula conjugada), con una molécula no modificada (por ejemplo, apelina 13), el aumento relativo de la vida media en suero o T1/2 se puede determinar. El aumento es deseablemente al menos aproximadamente de dos veces, pero un aumento más pequeño puede ser útil.

Polipéptidos de la invención:

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

En la realización 1, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente, Q, A o PE o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, Hc o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es un azufre y contiene amino-ácido seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, HhC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, o a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

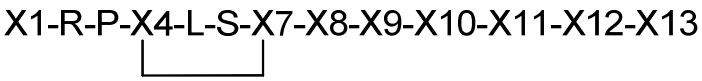
D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

En la realización 2, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 2):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y es bien sea ausente, Q, A o pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

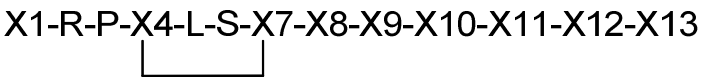
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , M, Nle o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido, o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

En la realización 2A, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 3):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente o pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

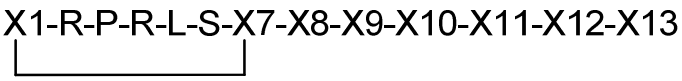
X10 es P o ausente;

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

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido, o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

En la realización 3, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



III

en donde

X1 es el extremo N del polipéptido y se selecciona a partir de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X1;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

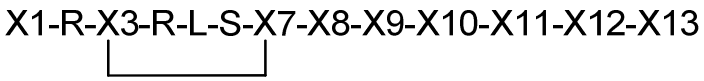
X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me)F, F, f, a, y y Nal;

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

En la realización 3A, la invención se refiere a polipéptidos de la Fórmula III en la que X11 es D-Nle, Nle o f, o una amida, un éster o una sal del mismo.

En la realización 4, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula IV (SEQ ID NO: 5):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y es bien sea ausente, Q, A o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

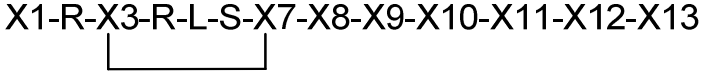
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 4A, la invención por lo tanto proporciona un péptido o un polipéptido de la fórmula IV (SEQ ID NO: 6):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está bien sea ausente o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

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

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 5, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4 en la que X1 es PE; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 5A, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4 en la que X1 es A o Q; o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En un aspecto particular de esta forma de realización, el péptido está unido químicamente o fusionado a una fracción de extensión de vida media a través de su extremo A o Q N.

En la realización 6, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1, 2, 4 y 4A en la que X1 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 7, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 4 y 6 en donde el extremo N es una amida; o una sal del polipéptido.

En la realización 8, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 7 en donde el extremo N es una amida de la fórmula-NHR y R es acetilo, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-, o Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-; o una sal del polipéptido.

En la realización 8A, la invención se refiere a un polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 4 y 7 en donde el extremo N es una amida de la Fórmula NHR1 en el que R1 es $CH_3C(O)$-, CH_3-$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-C(O)-, palmitoil$(O2Oc)_p$, miristoílo$(O2Oc)_p$, lauroilo $(O2Oc)_p$ 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;

Lauroilo(O2Oc) es $C_{11}H_{23}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Miristoilo(O2Oc) es $C_{13}H_{27}C(O)NH$-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-;

Palmitoilo(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. Ejemplos de amidas del extremo N se han descrito en la solicitud provisional de EE.UU. No. 61/591.557 (Expediente de Agente Número PAT054961-US-PSP) presentado el 27 de enero de 2012, que se incorpora como referencia.

En la realización 9, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8A en donde X13 es F o f; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 10, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8A en donde X13 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 11, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-10 en donde X12 está ausente; o una amida, y éster o una sal del polipéptido.

En la realización 12, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 11 en donde el extremo C es una amida; o una sal del polipéptido.

En la realización 13, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 12 en donde el extremo C es una amida de la Fórmula –C(O)-R2 y R2 es-NH_2,-NH-Me,-NH-NHBn,-$N(CH_3)$-$(CH_2)_2$-Ph o-NH-$(CH_2)_2$-Ph; o una sal del polipéptido.

En la realización 14, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-13 en donde X8 es K; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 15, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 14 en donde X9 es G; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 16, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 15 en donde X10 es P; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

19.

En la realización 17, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 16 en donde X11 es Nle o D-Nle; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 17A, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en donde el extremo C que consta de la fracción de X11-X12-X13 se selecciona de Nle-P-fenetilamina, Nle-P-(N-Me)F, Nle-P-NH2, Nle-Phenetilamina, (D-Nle)-fenetilamina, Nle-P-f, D-Nle-a-f, (D-Nle)-NH2, (D-Nle)-f, (D-Nle)-a-d, (D-Nle)-a-y, (D-Nle)-(D-Nva)-f, Nle-P-F, Nle-P-a, Nle-P-NaI y (D-Nle)-(D-Abu)-f, o una sal del polipéptido. En un aspecto particular de esta realización, la invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la realización 17A en la que el extremo C que consiste de la fracción de X11-X12-X13 se selecciona a partir de (D-Nle)-fenetilamina, (D-Nle)-a-f y f-a-f, o una sal del polipéptido.

En una realización 17B, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 17, en donde al final dos de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En otra realización, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en donde al menos tres de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13. En aún otra realización, la invención se refiere a un péptido o polipéptido de cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en el que al menos cuatro de los aminoácidos X1, X3, X4 y X7 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr-1-apelina-13.

En otra realización, los aminoácidos X1, X3, X4 y X7-X13 son los definidos por los aminoácidos X1, X3, X4, y X7-X13 en la sección de Ejemplos a continuación.

En otra realización, los péptidos individuales según la invención son aquellos listados en la sección de Ejemplos a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

A menos que se especifique lo contrario, el término “polipéptido de la presente invención” se refiere a un polipéptido de la Fórmula (I) y subfórmulas de la misma (Fórmulas II, III a IV); o una amida, un éster o una sal del mismo.

A menos que se especifique lo contrario, los términos “polipéptidos de la presente invención,” “péptidos de la presente invención,” “agonistas peptídicos de apelina,” y similares se refieren a péptidos y polipéptidos de la Fórmula I y subfórmuilas de los mismos (Fórmulas II, III, o IV); o una amida, un éster o una sal de los mismos. Los péptidos y polipéptidos de la invención demuestran actividad equivalente o mejorada y/o estabilidad plasmática sobre péptidos de apelina conocidos y polipéptidos descritos en la presente, incluyendo pero sin limitar a apelina tipo silvestre, apelina-13 y pyr-1-apelina-13.

Los péptidos y polipéptidos de la invención también incluyen péptidos y polipéptidos que son al menos 95% idénticos a los péptidos y polipéptidos según cualquiera de las Fórmulas I, II, III o IV, o una amida, un éster o una sal de los mismos, así como también a cualquiera de los péptidos o polipéptidos específicamente listados en la presente, incluyendo pero sin limitar a los ejemplos experimentales.

Como se utiliza en la presente, la frase "secuencia aminoácida homóloga," o variaciones de la misma, se refiere a las secuencias caracterizadas por una homología, a nivel aminoácido, de por lo menos un porcentaje determinado y se utiliza de manera intercambiable con "identidad de secuencia". Secuencias aminoácidas homólogas incluyen las secuencias aminoácidas que contienen sustituciones aminoácidas conservativas y cuyos polipéptidos tengan la misma unión y/o actividad. En algunas realizaciones, una secuencia aminoácida es homóloga si tiene al menos 60% o más, hasta 99%, de identidad con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, una secuencia aminoácida es homóloga si comparte uno o más, hasta 60 sustituciones, adiciones, o supresiones aminoácidas con una secuencia de comparación. En algunas realizaciones, las secuencias aminoácidas homólogas no tienen más de cinco o no más de tres sustituciones aminoácidas conservadoras.

La homología también puede ser a nivel de polipeptídico. El grado o porcentaje de identidad de péptidos o polipéptidos de la invención, o porciones de los mismos, y secuencias aminoácidas diferentes se calcula como el número de equivalencias exactas en una alineación de dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o la "secuencia extraña", la que sea más corta. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

Un polipéptido que comprende una secuencia aminoácida que tiene una homología de 80-99.9% aproximadamente, preferiblemente 90-99.9% con la secuencia aminoácida descrita en los ejemplos específicos, y que posee una estabilidad plasmática superior a apelin-13 orpyr-1-apelin-13, están bajo la categoría del polipéptido de la invención. En una realización, la mejora de estabilidad plasmática es al menos de dos veces. En una realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 60 minutos, o al menos 80 min, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

El término "sustancialmente equivalente" significa la naturaleza de la actividad de unión al receptor, actividad de transducción de la señal y similares es equivalente. Por lo tanto, es permisible que incluso diferencias entre las calidades tales como la fuerza de la actividad de unión al receptor y el peso molecular del polipéptido estén presentes.

Un polipéptido como se describe aquí, o un equivalente sustancial al mismo, por sustitución, deleción, adición o inserción de uno o más de los aminoácidos se pueden mencionar como polipéptidos que contienen equivalentes sustanciales de secuencias de aminoácidos en el sentido anterior. Un polipéptido como se describe en la presente, o un equivalente sustancial del mismo, por la sustitución de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3 y más preferiblemente 1 o 2 aminoácidos por aminoácidos naturales o no naturales se pueden mencionar como polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de secuencias de aminoácidos en el sentido anterior. Otras modificaciones y alteraciones pueden incluir la sustitución de un aminoácido L por un aminoácido D, u otra variación incluyendo, pero no limitado a, fosforilación, carboxilación, alquilación y similares, siempre y cuando la actividad agonista de apelina del péptido o polipéptido de las fórmulas I, II, III o IV se mantiene y la estabilidad del plasma se mejora sobre la forma piroglutamada de apelina-13.

En la realización 19, la invención además se refiere a un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende:

a. un péptido o polipéptido de las Fórmulas I, II, III o IV, una amida, sal o éster del mismo, según cualquiera de las realizaciones anteriores;
b. Una fracción de extensión de vida media;

en donde dicho péptido o polipéptido y dicha fracción de extensión de vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 19A, la fracción de extensión de vida media está unida al extremo N del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 19B, la fracción de extensión de vida media está unida covalentemente o fusionada al extremo C del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 19C, la fracción de exrensión de vida media está covalentemente unida o fusionada a una cadena lateral del péptido de la Fórmula I, II, III o IV, por ejemplo, la vida media está covalentemente unida o fusionada a un grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4-amino-Isn, opcionalmente a través de una fracción enlazadora. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está unida al extremo N del péptido de la fórmula I, II, III o IV, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En la realización 20, la invención se refere a el bioconjugado o un mutimero del mismo, de acuerdo con la realización 19, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo, un ácido graso o una albúmina de suero humano.

En la realización 21, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con las realizaciones 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es un fragmento Fc modificado de FcLALA con una mutación LALA (L234A, L235A).

En la realización 22, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 21 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que se fusiona o se une covalentemente a un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV a través de un enlazador y en donde el enlazador tiene la siguiente fórmula:-[GGGGS] n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ

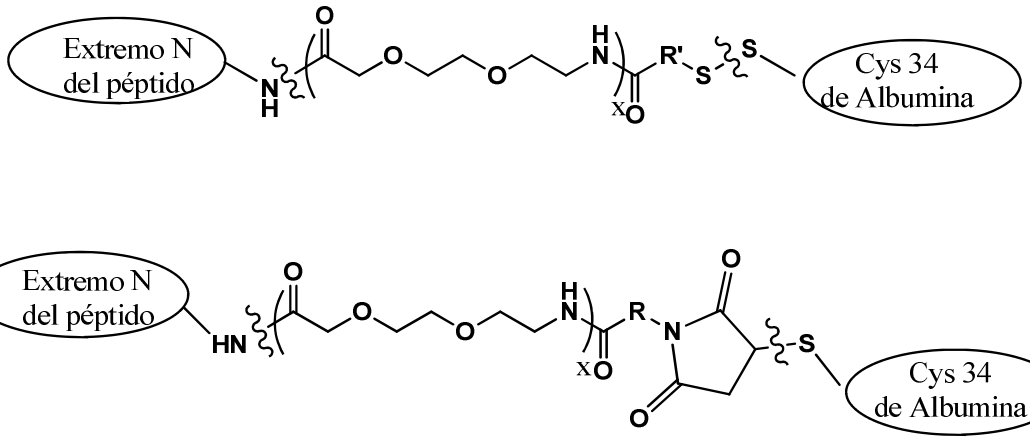
ID NO: 7) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural.

En la realización 23, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 22 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I se selecciona del QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 10), en donde los dos aminoácidos marcados con "*" representar los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o de amida a través de su cadena lateral.

En la realización 23A, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con la realización 22 o 23 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisana del extremo C ha sido eliminada o sustituida por alanina. Tales variantes Fc se han descrito en la solicitud co-presentada (Solicitud provisional EE.UU. No 62/015848:número de expediente PAT055781-US-PSP02) y han generado proteínas de fusión más estables con péptidos/polipéptidos de apelina.

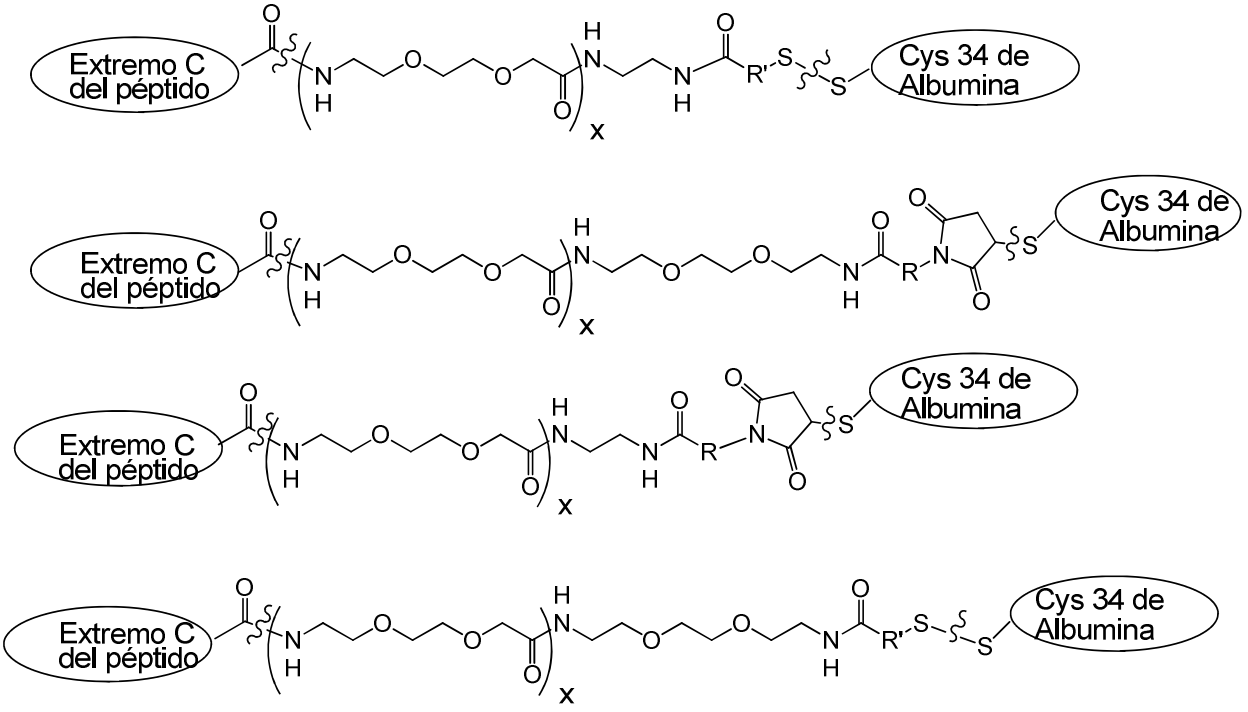
En la realización 24, la invención se refiere al bioconjugado o multímero del mismo de acuerdo con la realización 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es albúmina de suero humano.

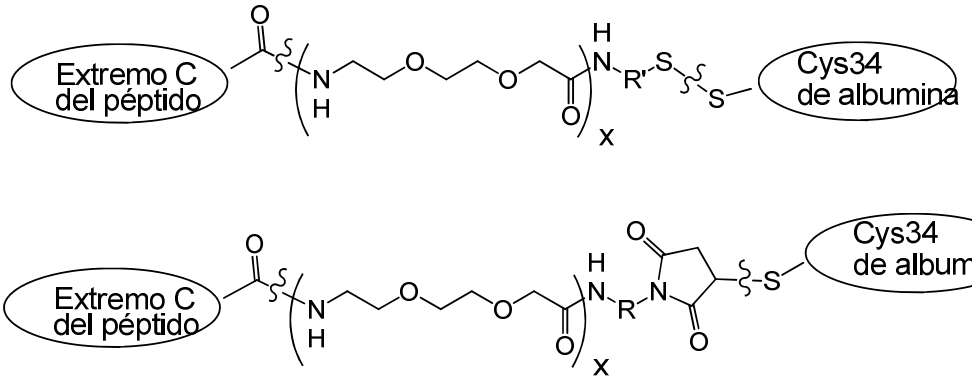
En la realización 25, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 24, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo N de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:



en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

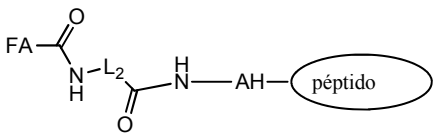
En la realización 26, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 19 o 20, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo C de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:



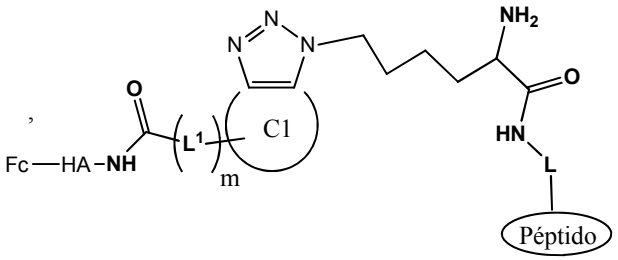


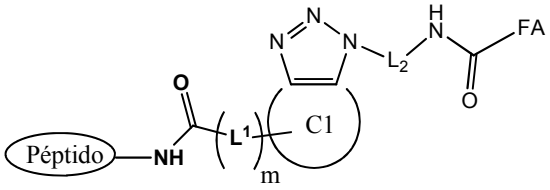
en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

En otra realización, el bioconjugado de la invención tiene las siguientes fórmulas:



,





o

Fc-[GGGG]n-LPETL-Péptido Extremo N (SEQ ID NO: 11)

en donde el péptido es el extremo N del péptido, A es alanina, H es histidina, n es 1, 2 o 3, m es 0 o 1, L y L2 son enlazadores, C1 es un sistema de anillo mono, di o tricíclico carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido por flúor y L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en donde la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= o), y en donde uno o más de carbono se sustituye por O o NH. En un aspecto particular de esta realización, L y L2 son enlazadores PEG.

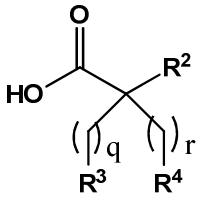
Fracción de Extensión de Vida Media

La fracción de extensión de vida media de la invención puede ser covalentemente unida, ligada, conjugada o fusionada con un análogo de péptido o polipéptido. Una fracción de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un ácido graso, un grupo de colésterol, un carbohidrato u oligosacárido; o cualquier proteína natural o sintética, polipéptido o péptido que se une a un receptor de rescate. Preferiblemente, la fracción de extensión de vida media está enlazada covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador, a proteína plasmática (albúmina e inmunoglobulina) con largas vidas medias en suero. Por ejemplo, la fracción de extensión de vida media es un

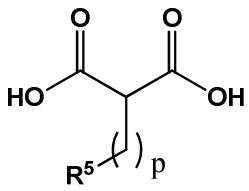
dominio constante de IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, la región Fc), albúmina de suero humano (HSA), o un polipéptido de unión a albúmina o residuos (por ejemplo un ácido graso). Preferiblemente, la porción de fracción de extensión de vida media del bioconjugado es una albúmina de suero humano, un ácido graso o una región Fc.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen albúmina, que se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodaltons en su forma monomérica, dependiendo de la especie de origen. El término "albúmina" se usa indistintamente con "albúmina de suero" y no está destinada a definir la fuente de la albúmina que forma un conjugado con los péptidos modificados de la invención. Por lo tanto, el término "albúmina", como se usa en el presente documento puede referirse bien sea a la albúmina purificada a partir de una fuente natural tal como sangre o fluidos sericos, o puede referirse a albúmina quimicamente sintetizada o recombinantemente producida. Péptidos o polipéptidos de la invención modificados son preferentemente atados al grupo tiol libre de la cisteína-34 en la superficie de la albúmina, opcionalmente a través de un enlazador.

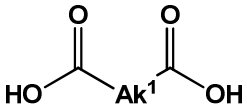
Las fracciones de extensión de vida media incluyen ácidos grasos, que pueden ser definidos como un alquilo C6-70, un alquenilo C6-70 o una cadena de alquinilo C6-70, cada uno de los cuales es sustituido con al menos un ácido carboxílico (por ejemplo 1, 2, 3 o 4 CO2H) y además opcionalmente sustituido por el grupo hidroxilo. Ejemplos de ácidos grasos se definen por las Fórmulas A1, A2 y A3:



A1



A2



O A3

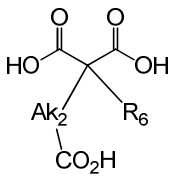
R^2 es CO_2H, H;

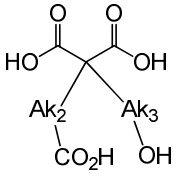
R^3, R^4 y R^5 son independientemente de cada uno de los demás H, OH, CO_2H,-$CH=CH_2$ o –C≡CH;

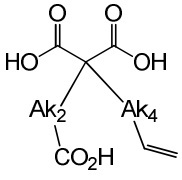
Ak1 es un alquileno C6-C30 ramificado;

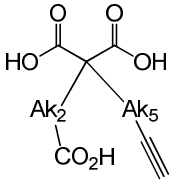
q, r y p son independientemente uno de otro un número entero entre 6 y 30; o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Ejemplos de ácidos grasos se seleccionan a partir de:

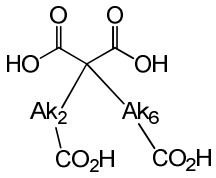


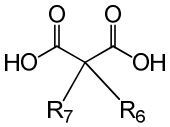
,


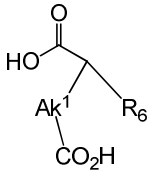
,


,


,

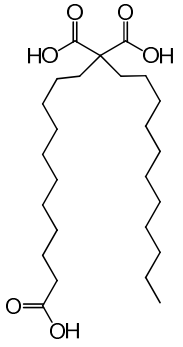


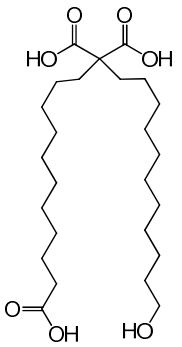
,


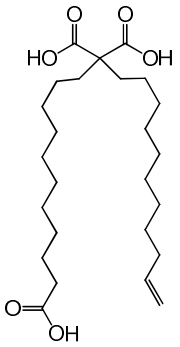
y


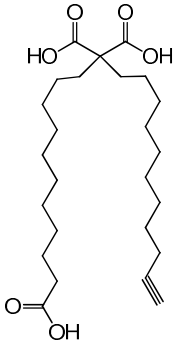
en donde Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 y Ak^6 son independientemente un (C_{8-20})alquileno, R^6 y R^7 son independientemente alquilo(C_{8-20}).

Más específicamente, los ácidos grasos se seleccionan a partir de:

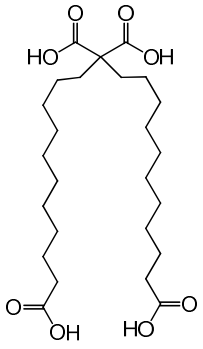


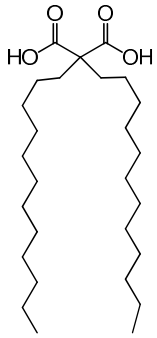
,


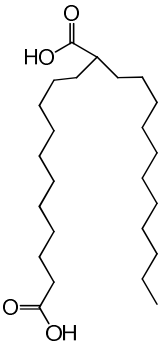
,


,


,



,


y


.

Estas fracciones de ácidos de ácidos grasos se han descrito en la solicitud co-presentada, Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015862; número de expediente PAT056274-US-PSP.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen "Fc nativo" que se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento no fijador de antígenos resultante de la digestión del anticuerpo entero o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente original de la inmunoglobulina del Fc nativo es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, aunque IgG1 e IgG2 son las preferidas. Las moléculas Fc nativas están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden conectarse a formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces de disulfuro) y asociación no covalente. El número de enlaces de disulfuro intermoleculares entre las subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas oscila de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 y IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por puentes de disulfuro resultante de la digestión de papaína de una IgG (véase Ellison, 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). El término "Fc nativo" como se utiliza en la presente es genérico a las formas monomérica, dimérica y multimérica.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen la “variante Fc” que se refiere a una molécula o secuencia que es modificada desde un Fc nativo pero aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor Fc neonatal). Las Publicaciones Internacionales No. WO 97/34631 y WO 96/32478 describen variantes Fc de ejemplo, así como la interacción con el receptor de salvamento, y se incorporan en la presente como referencia. Por lo tanto, el término "variante Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que se pueden quitar, ya que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para el bioconjugado de la invención. Por lo tanto, el término "variante Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios Fc nativos o residuos, o en los que uno o más sitios Fc o residuos se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) formación de enlaces de disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal en la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación (5), interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor

Fc diferente de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los variantes Fc se describen más adelante con más detalle.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen variantes Fc en donde la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina.

Las fracciones de extensión de vida media se refieren al "dominio Fc", que abarca variantes y secuencias nativas Fc y Fc como se definió anteriormente. Al igual que con los variantes Fc y moléculas Fc nativas, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas desde el anticuerpo completo o producidas por otros medios. En algunas realizaciones de la presente invención, un dominio Fc puede estar conjugado a un polipéptido de la fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I-IV a través de, por ejemplo, un enlace covalente entre el dominio Fc y la secuencia de péptidos. Tales proteínas Fc pueden formar multímeros a través de la asociación de los dominios Fc y estas proteínas Fc y sus multímeros son un aspecto de la presente invención.

Las fracciones de extensión de vida media incluyen el "fragmento Fc modificado", que significará un fragmento Fc de un anticuerpo que comprende una secuencia modificada. El fragmento Fc es una porción de un anticuerpo que comprende CH2, CH3 y parte de la región de bisagra. El fragmento Fc modificado puede derivarse a partir de, por ejemplo, IgGl, IgG2, IgG3, o IgG4. FcLALA es un fragmento Fc modificado con una mutación LALA (L234A, L235A), que dispara ADCC con eficiencia reducida, y fija y activa el complemento humano de manera debil. Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104. Modificaciones adicionales al fragmento Fc se describen en, por ejemplo, la Patente EE.UU. No. 7,217,798.

El término "multímero" tal como se aplica a dominios Fc o molécula que comprende los dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas polipeptídicas asociadas covalentemente. Por ejemplo las moléculas de IgG forman típicamente dímeros y, por tanto, un bioconjugado que comprende una molécula IgG dimérica se puede fusionar con dos cadenas de polipéptidos de la Fórmula I, IA, II, III o IV.

Enlazador

Cualquier grupo enlazador es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crítica, ya que sirve principalmente como un espaciador.

El enlazador es una fracción química que contiene dos grupos reactivos/ grupos funcionales, uno de los cuales pueden reaccionar con el polipéptido y la otra con la fracción

de extensión de vida media. Los dos grupos reactivos del enlazador están vinculados a través de un grupo de unión, la estructura del cual no es crítica, siempre y cuando no interfiera con el acoplamiento del enlazador al péptido y la fracción de extensión de vida media.

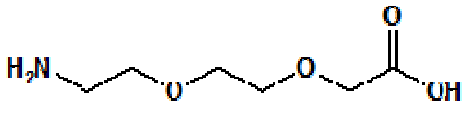
El enlazador puede estar formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la presente invención, el enlazador se compone de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en donde los aminoácidos son seleccionados a partir de los 20 aminoácidos naturales. En varias realizaciones, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan a partir de los aminoácidos glicina, serina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, cisteina y lisina. En algunas realizaciones, un enlazador está formado por una mayoría de aminoácidos que son estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. En algunas realizaciones, los enlazadores son poliglicinas, polyalaninas, combinaciones de glicina y alanina (tales como poli (Gly-Ala)), o una combinación de glicina y serina (como poli(Gly-Ser)). En algunas realizaciones, un enlazador comprende una mayoría de aminoácidos seleccionados de histidina, alanina, metionina, glutamina, asparagina y glicina. En algunas realizaciones, los enlazadores contienen la fracción de poli-histidina. Ejemplos de enlazadores son enlazadores que comprenden el motivo AH, MHA o AHA. Tales motivos se han descrito en las aplicaciones copendientes y aplicaciones co-presentadas, números de expediente de Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015862: PAT056274-US-PSP y expediente de Solicitud provisional de EE.UU. Número 62/015868: PAT056275-US-PSP, que es beneficioso para la conjugación selectiva en el extremo N de un péptido o polipéptido.

Otros ejemplos de enlazadores comprenden el motivo GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13), GGGGS (SEQ ID NO: 14), GS o GG.

En alguna otra realización, el enlazador comprende motivos de reconocimiento para la enzima. Un ejemplo es el motivo LPXTG/A que puede ser incluido en el extremo C en donde X es cualquier aminoácido, más comúnmente un E: Ácido Glutámico (L: leucina, P: prolina, T: treonina, G: Glicina, A; Alanina). (Carla P. Guimaraes: “Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions”, Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787-1799)

En otras realizaciones, el enlazador comprende de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan a partir de aminoácidos no naturales. Aunque se prefiere un enlazador de 3-15 residuos de aminoácidos para la conjugación con la fracción de extensión de vida media, la

presente invención contempla enlazadores de cualquier longitud o composición. Un enlazador de aminoácidos preferido es O2Oc de la siguiente fórmula:

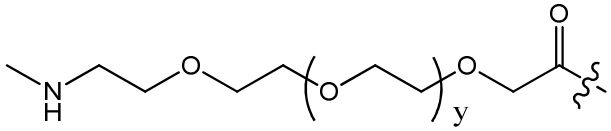


o sus unidades de repeteción.

Los enlazadores descritos en este documento son de ejemplo, y los enlazadores que son mucho más largos y que incluyen otros residuos se contemplan en la presente invención. Los enlazadores no peptídicos también se contemplan en la presente invención.

La porción enlazadora del enlazador puede comprender uno o más grupos alquilo, grupos alcoxilo, grupos alquenilo, grupos cicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo y grupos heterocíclicos o combinación de los mismos. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores alquilo tales como-NH-$(CH_2)_Z$C(O)- o-S-(CH_2)z-C(O) – o-O-(CH_2)z-C(O)-en donde z es 2-20. Estos enlazadores de alquilo pueden además sustituirse por cualquier grupo que no produzca impedimento estérico, incluyendo pero sin limitar a, un alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH2, o fenilo.

El enlazador también puede ser de naturaleza polimérica. El enlazador puede incluir cadenas poliméricas o unidades que son bioestables o biodegradables. Los polímeros con enlace de repetición pueden tener diversos grados de estabilidad en condiciones fisiológicas en función de la labilidad de enlaces. Los polímeros pueden contener enlaces tales como policarbonatos (-OC(O)-O-), poliésteres (-C(O)-O-), poliuretanos (-NH-C(O)-O-), poliamida (-C (O)-NH-). Estos enlaces se proporcionan a modo de ejemplo, y no pretenden limitar el tipo de enlaces empleables en las cadenas poliméricas o enlazadores de la invención. Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, poliaminoácidos, anhídrido maleico de diviniléter, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano, polipropilenglicol, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, celulosa y derivados de celulosa, almidón y derivados de almidón, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, éter poliviniletílico, y similares y mezclas de los mismos. Un enlazador polimérico es, por ejemplo PEG. Un enlazador no peptídico ilustrativo es un enlazador de glicol de polietileno:



en donde y es tal que el enlazador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kD, por ejemplo, 100 a 500 kD.

Preferiblemente, la fracción enlazadora contiene una o más fracciones de aminoácidos tales como por ejemplo unidad de (O2Oc) o glicina o serina, alquileno C1-4-C (O)-, alquileno C1-4,-NH-alquileno C2-6-NH-o unidades de NH CH_2CH_2 CH_2CH_2-NH diamino o combinación de los mismos y la fracción enlazadora enlazó 2 grupos reactivos o grupos funcionales.

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

Preparación del péptido o polipéptido y constructo de péptido-enlazador para la unión a una fracción de extensión de vida media:

Los péptidos y polipéptidos de apelina y/o constructo péptido-enlazador de la invención se pueden producir mediante cualquiera de los procesos químicos sintéticos o por métodos recombinantes o combinación de ambos métodos. Los péptidos de apelina y/o constructos péptido-enlazador se pueden preparar como de longitud completa o pueden sintetizarse como fragmentos de longitud no completa y pueden unirse. Los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos por los procedimientos conocidos per se para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de una síntesis de fase sólida y una síntesis de fase líquida. Por lo tanto, el péptido y polipéptido de interés puede ser producido por 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, el grupo protector se separa después de lo cual un péptido deseado se puede fabricar. Los métodos conocidos para la condensación y desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente bibliografía (1)-(5).

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

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

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

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

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

Después de la reacción, el péptido puede ser purificado y aislado mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía de líquidos, y recristalización. Cuando el polipéptido aislado en los ejemplos anteriores es un compuesto libre, éste puede convertirse en una sal apropiada mediante el método conocido. A la inversa, donde el producto aislado es una sal, éste puede ser convertido en el péptido libre mediante el método conocido.

La amida de polipéptido se puede obtener mediante el uso de una resina para la síntesis de péptido que es adecuada para la amidación. La resina incluye resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-benciloxibencilo, resina de 4-metilbenz-hidrilamina, resina PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfeniilacetamidometilo, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil) fenoxilo, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil) fenoxilo, resina de cloruro de 2-clorotritilo, y así sucesivamente. El uso de tal resina, aminoácidos cuyos grupos α-amino y grupos funcionales de la cadena lateral han sido protegidos adecuadamente se condensan en la resina de acuerdo con la secuencia del péptido objetivo por diversas técnicas de condensación que son conocidos per se. Al final de la serie de reacciones, el péptido o péptido protegido se elimina desde la resina y se eliminan los grupos protectores y si es necesario, los enlaces de disulfuro se forman para obtener el polipéptido objetivo.

Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos se puede utilizar tal como

HATU, HCTU o por ejemplo, una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, N,N'-diisopropilcarbodiimida, y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Para la activación con tal reactivo tal, un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, HOBt o Oxyma puro se puede utilizar. El aminoácido protegido puede ser añadido directamente a la resina junto con los reactivos de activación e inhibidor de racemización o ser pre-activado como anhídrido simétrico de ácido, éster de HOBt, o éster HOOBt después se añadió a la resina. El solvente para la activación de aminoácidos protegidos o condensación con la resina se puede seleccionar adecuadamente de entre los disolventes que se sabe son útiles para las reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, se pueden mencionar N, N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, sulfóxido de dimetilo, DMF, piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo, o mezclas adecuadas de éstos. La temperatura de reacción puede seleccionarse a partir del rango hasta ahora conocido por ser útil para la formación de enlaces de péptidos y por lo general se selecciona de entre el intervalo de-20° C-50° C aproximadamente. El derivado de aminoácido activado se usa generalmente en una proporción de 1,5-4 veces en exceso. Si se encuentra que la condensación es insuficiente por una prueba que utiliza la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin necesidad de retirar el grupo protector. Si la condensación repetida todavía no proporciona el suficiente grado de condensación, el grupo amino sin reaccionar puede ser acetilado con anhídrido acético o acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino para el aminoácido de material de partida incluye Z, Boc, terc-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, CI-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioilo, o Fmoc. El grupo protector carboxilo que se puede usar incluye, pero no se limita a alquilo C1-6, cicloalquilo C3-8 y arilo C6-10-alquilo C1-2 antes mencionados, así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, terc-butoxicarbonilhidrazido, y tritilhidrazido.

El grupo hidroxilo de serina y treonina puede ser protegido por ésterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha ésterificación incluye grupos derivados de carbono, tales como grupos alcanoilo inferiores, por ejemplo acetilo etc, grupos aroilo, ej., benzoilo etc, benciloxicarbonilo, y etoxicarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación

incluye bencilo, tetrahidropiranilo, y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina incluye Bzl, Cl_2-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z, y butilo terciario.

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

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

El método para la eliminación de grupos protectores incluye la reducción catalítica utilizando gas hidrógeno en presencia de un catalizador tal como negro de paladio o paladio sobre carbono, el tratamiento ácido con fluoruro de hidrógeno anhidro, ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, o una mezcla de tales ácidos, tratamiento base con diisopropiletilamina, trietilamina, piperidina, piperazina, reducción con sodio metálico en amoníaco líquido. La reacción de eliminación mediante el tratamiento ácido anteriormente mencionado se lleva a cabo generalmente a una temperatura de-20° a C-40° C y puede llevarse a cabo ventajosamente con la adición de un aceptor de cationes tal como anisol, fenol, tioanisol, m-cresol, p-cresol, sulfuro de dimetilo, 1,4-butanoditiol, 1,2-etanoditiol. El grupo 2,4-dinitrofenilo utilizado para proteger el grupo imidazol de la histidina puede ser eliminado por tratamiento con tiofenol, mientras que el grupo formilo utilizado para proteger el grupo indol de triptófano se puede eliminar por tratamiento alcalino con una solución diluida de hidróxido de sodio o amoníaco acuoso diluido así como el tratamiento con ácido mencionado anteriormente en la presencia de 1,2-etanoditiol, 1,4-butanoditiol.

El método para la protección de grupos funcionales que no deben tomar parte en la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden utilizar, el método de eliminación de los grupos protectores, y el método de activación de los grupos funcionales que van a tomar parte en la reacción puede seleccionarse todos judicialmente de entre los grupos y métodos conocidos.

Un otro método para la obtención de la forma de amida del polipéptido comprende la amidación del grupo α-carboxilo del aminoácido C-terminal primero, a continuación, se extiende la cadena del péptido al extremo N hasta la longitud de cadena deseada, y luego desproteger selectivamente el grupo α-amino del péptido C-terminal y el grupo α-carboxilo del aminoácido o péptido que es para formar el resto del polipéptido objetivo y la condensación de los dos fragmentos cuyo grupo α-amino y grupos funcionales de cadena lateral han sido protegidos con grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un disolvente mixto tal como el mencionado anteriormente en este documento. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser iguales a los descritos anteriormente en la presente. Desde el péptido protegido obtenido por condensación, todos los grupos protectores se eliminan mediante el método anteriormente descrito para proporcionar de ese modo el péptido crudo deseado. Este péptido crudo puede purificarse mediante procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal se liofilizó para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Para obtener un éster del polipéptido, el grupo a-carboxilo del aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para proporcionar un éster de aminoácido y, a continuación, se realiza el procedimiento descrito anteriormente para la producción de la amida.

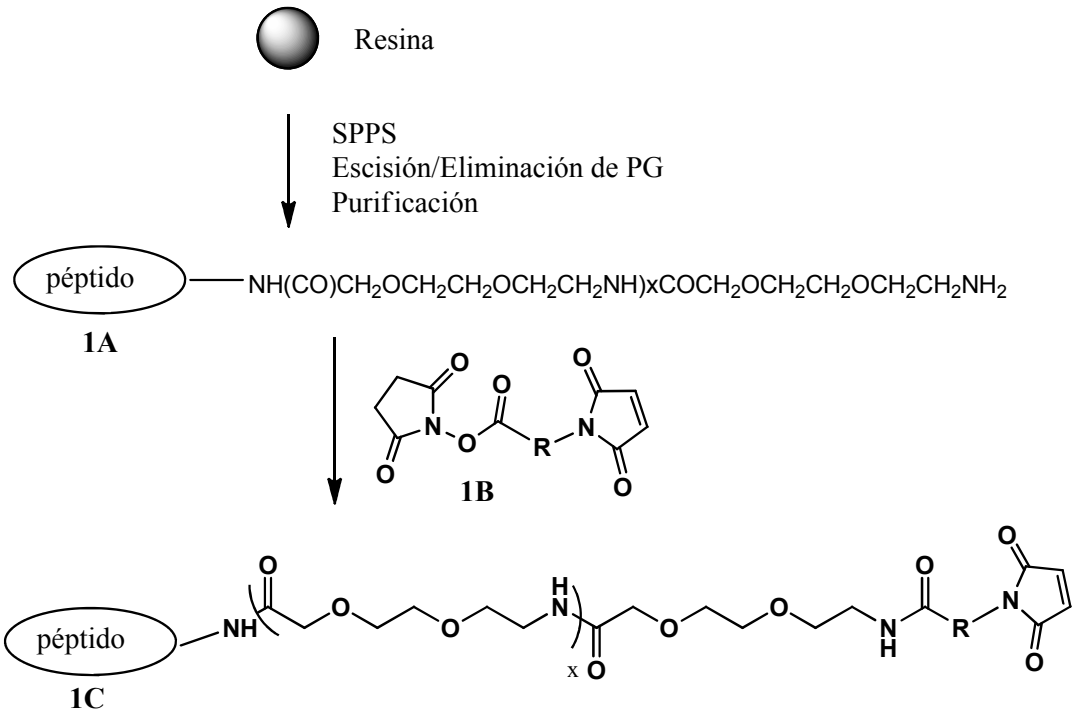
Alternativamente, los métodos de expresión recombinantes son particularmente útiles. Expresión de proteína recombinante utilizando una célula huésped (una célula diseñada artificialmente para comprender ácidos nucleicos que codifican la secuencia del péptido y que transcribirán y traducirán, y opcionalmente, secretarán el péptido en el medio de crecimiento celular) se utiliza rutinariamente en la técnica. Para el proceso de producción recombinante, un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido típicamente se sintetizará por métodos convencionales y se integrará en un vector de expresión. Tales métodos se prefieren particularmente para la fabricación de las composiciones de polipéptido que comprenden los péptidos fusionados a secuencias peptídicas adicionales u otras proteínas o fragmentos de proteínas o dominios. La célula hospedadora puede ser opcionalmente al menos una seleccionada de E. coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, levadura, células de insectos o de plantas, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de los mismos.

Los péptidos o polipéptidos terapéuticos modificados y/o constructo de péptido-enlazador incluyen grupos reactivos que pueden reaccionar con funcionalidades reactivas disponibles en la fracción de extensión de vida media para formar un enlace covalente. Los grupos reactivos son grupos químicos capaces de formar un enlace covalente. Los grupos reactivos generalmente pueden ser carboxilo, fosforilo, un grupo acilo, éster o anhídrido mixto, maleimida, imidato, piridina-2-il-disulfanilo, por lo tanto capaz de formar un enlace covalente con funcionalidades tipo grupo amino, grupo hidroxilo, grupo carboxilo o un tiol grupo en el sitio diana de la albúmina o dominio Fc. Grupos reactivos de particular interés para ligarse a una albúmina incluyen grupos que contienen maleimido-y grupos que contienen piridina-2-il-disulfanilo.

Funcionalidades son grupos en albúmina o dominio Fc con los que los grupos reactivos en péptidos o polipéptidos modificados son capaces de reaccionar con para formar enlaces covalentes. Funcionalidades incluyen grupos hidroxilo para la unión con entidades éster-reactivas, grupos tiol para reaccionar con maleimidas, grupos que contienen maleimido o piridina-2-ildisulfanilo, imidatos y grupos tioéster; grupos amino para la unión a ácido carboxílico, grupos fosforilo, grupos acilo; y grupos carboxilo para reaccionar con hidrazina, hidrazida o hidroxilamina.

Los esquemas 1 a 3 describen la síntesis del constructo péptido-enlazador en donde el péptido es un péptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV.

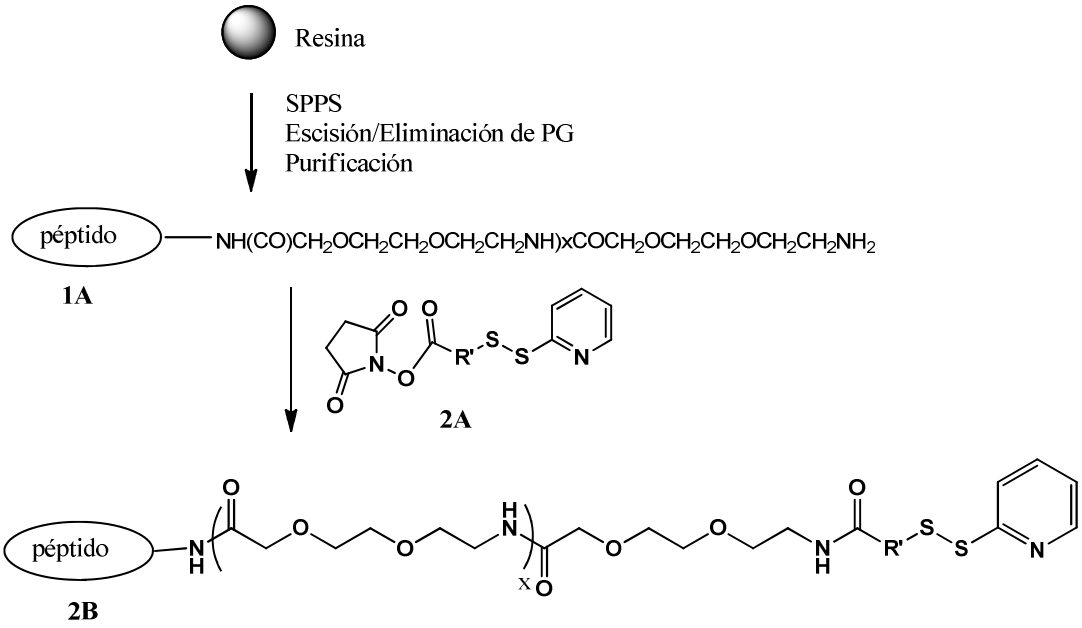
Esquema 1 describe la síntesis de un enlazador que contiene maleimida unido al extremo N-terminal de un polipéptido de las fórmulas I a IV.



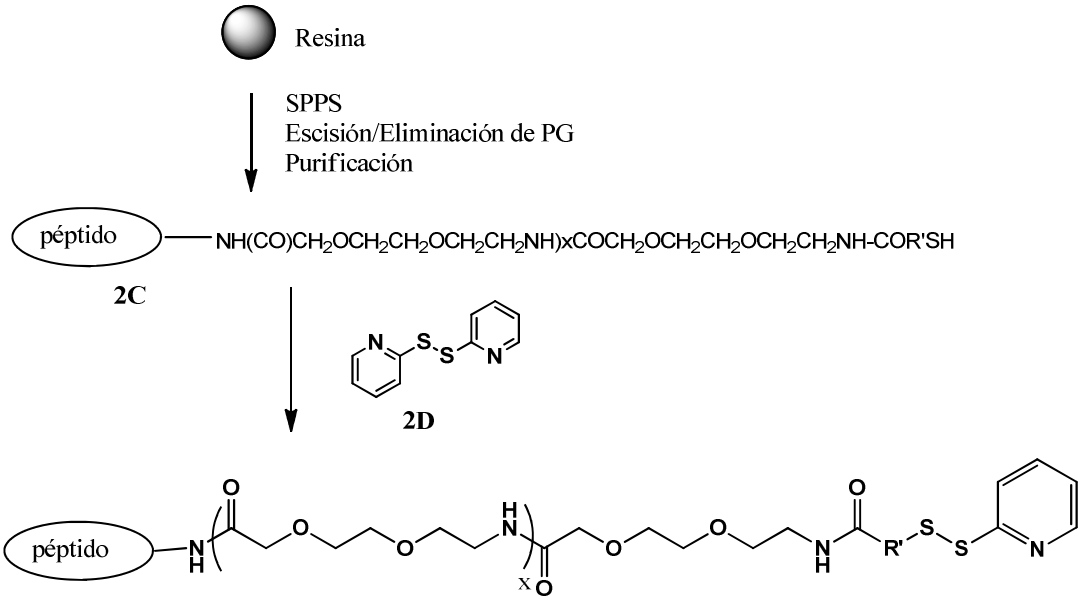
Esquema 1

El extremo N-terminal del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos O2Oc (x es 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10 y más preferiblemente de 3 a 6) de acuerdo con la bien establecida química de acoplamiento de amidas para generar (1A). La funcionalidad amino terminal de (1A) se hace reaccionar con un ácido activado (1B) en la que R es alquileno lineal o ramificado, arilo, heteroarilo, cicloalquilo o combinación de los mismos, con el fin de generar el péptido-maleimida que contiene constructo enlazador (1C). El ácido activado (1B) está disponible comercialmente o fácilmente disponible a partir de su ácido carboxílico correspondiente de acuerdo con la técnica conocida por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. Preferiblemente, R es un alquileno lineal, y más preferiblemente R es-CH_2-CH_2-. Alternativamente, para los péptidos que contienen una funcionalidad amino en la cadena lateral (por ejemplo péptido que contiene una lisina), grupo protector ortogonal tal como Alloc se requiere antes de la reacción de acoplamiento, seguido por el paso de desprotección adicional con el fin de obtener (1C).

Esquema 2A y 2B describen la síntesis de piridina-2-il-disulfanilo que contiene enlazador unido al extremo N-terminal de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I a IV.



Esquema 2A

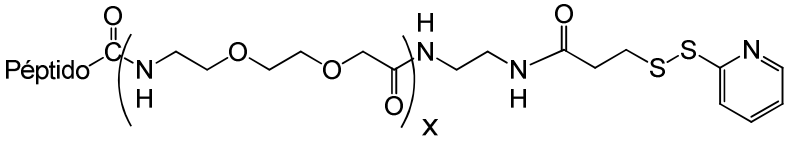


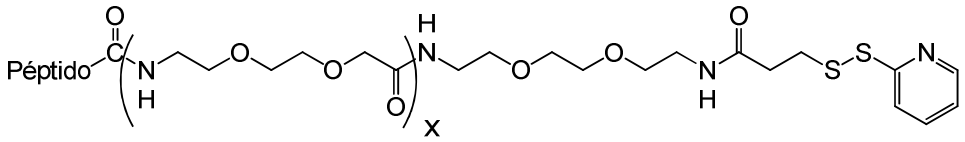
Esquema 2B

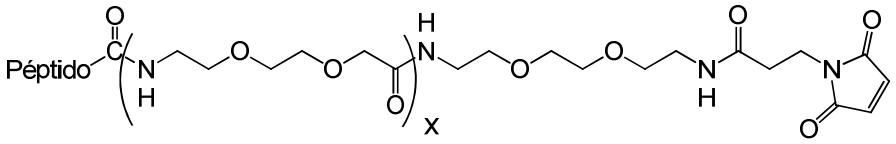
El constructo péptido-enlazador (1A) se prepara como se describe en el Esquema 1 y se hace reaccionar adicionalmente con un ácido activado de la fórmula (2a) en la que R' es un alquileno lineal o ramificado, para generar un péptido-piridina-2-il-disulfanilo que contiene el

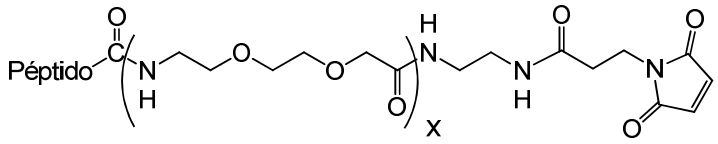
constructo enlazador (2B). El ácido activado (2A) está disponible comercialmente o fácilmente disponible a partir de su ácido carboxílico correspondiente de acuerdo con técnicas conocidas por alguien de habilidad ordinaria en la técnica. Preferiblemente, R' es-CH_2-CH_2-. Alternativamente, el constructo de péptido-enlazador (2C) se puede preparar usando HO_2C-R'-SH, o una forma protegida del mismo (por ejemplo, grupos tritilo o Acm, lo que requiere etapas de desprotección adicionales), y se hace reaccionar adicionalmente con (2D) para generar péptido-piridina-2-il-disulfanilo que contiene el constructo enlazador (2B).

Grupos reactivos similares están unidos al extremo C-terminal del péptido de una manera similar a la descrita en los Esquemas 1, 2A y 2B usando una unidad diamino tal como por ejemplo –NH-CH_2CH_2-NH- o –NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-. Ejemplos no limitantes de tales constructos péptido enlazador son:

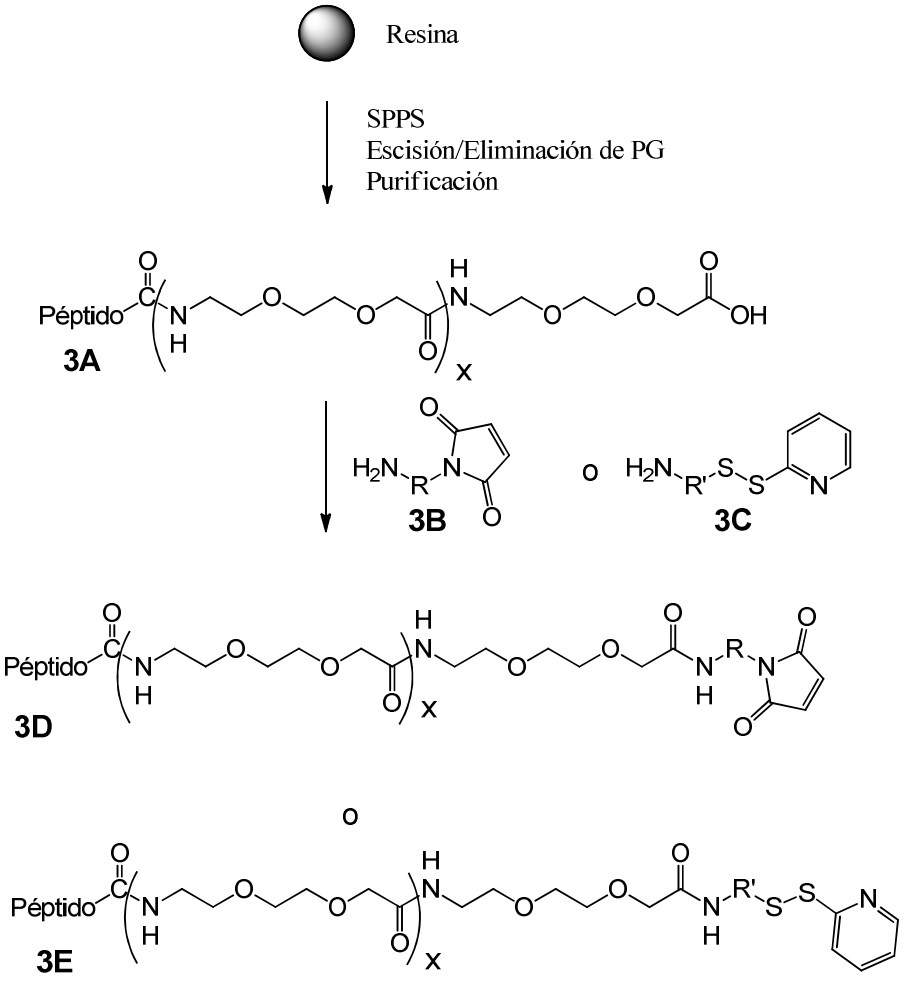








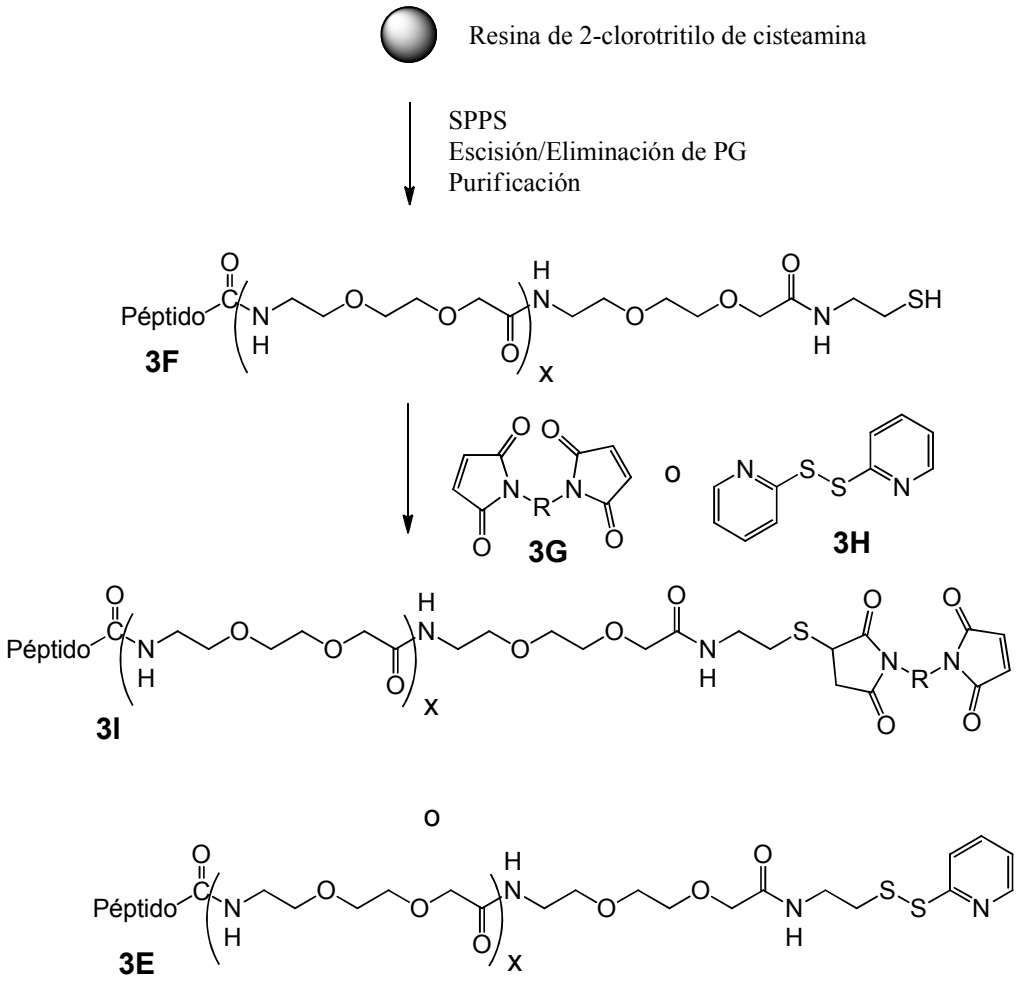
Alternativamente el grupo reactivo de maleimida o piridina-2-il-disulfanilo puede estar unido a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV de acuerdo con el Esquema 3A, 3B y 3C:



Esquema 3A

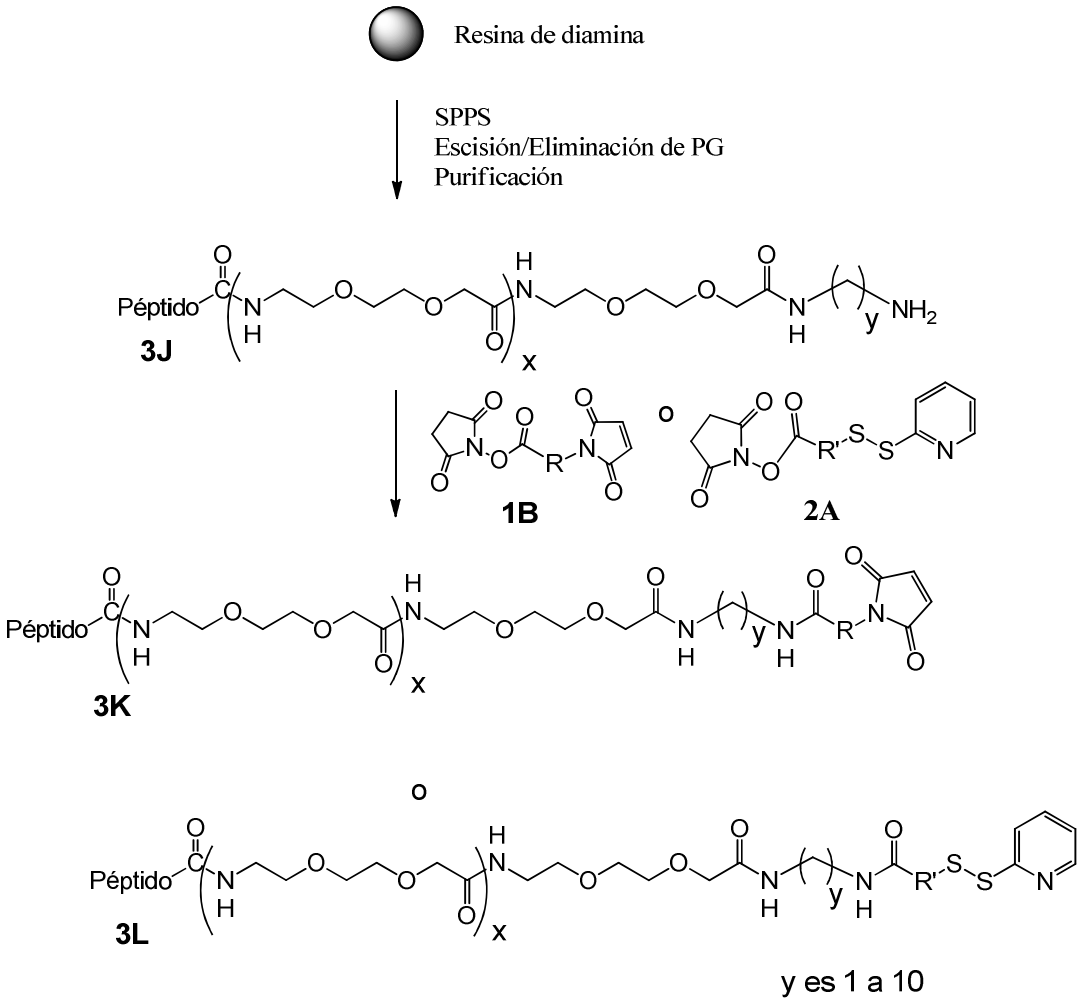
El grupo de ácido carboxílico en el extremo C-terminal del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos O2Oc utilizando condiciones de acoplamiento de amida estándar para generar (3A). La funcionalidad de ácido carboxílico terminal reacciona con el grupo amino de (3B) o (3C) en donde R y R' son como se define anteriormente, con el fin de generar los constructos activados péptido enlazador (3D) o (3E). Adicionalmente, cuando un péptido contiene una cadena lateral de funcionalidad carboxilo (por ejemplo, Glu o Asp), se

requieren grupo protector ortogonal (por ejemplo, O-alilo) y etapas de desprotección adicionales.



Esquema 3B

El constructo péptido-enlazador 3F se puede obtener utilizando una resina de cisteamina 2-clorotritilo y después se hace reaccionar con 3G o 3H para generar con constructo péptido-enlazador 3I o 3E, respectivamente.

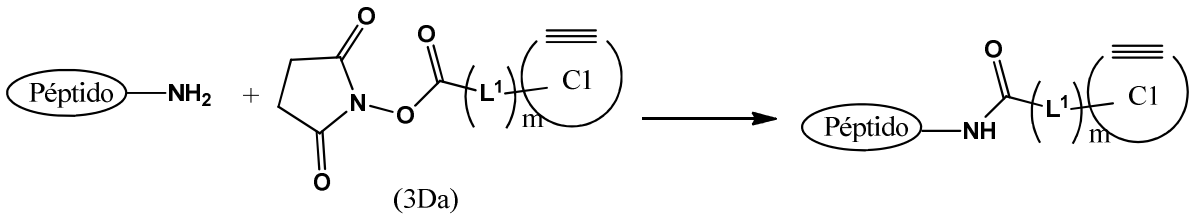


Esquema 3C

El constructo péptido-enlazador (3J) puede obtenerse a partir de una resina de diamina y se hace reaccionar adicionalmente con (1B) o (2A) para generar un constructo péptido-enlazador de la Fórmula (3K) o (3L), respectivamente.

Los Esquemas 1 a 3C describen constructos péptido-enlazador, más particularmente para su uso en la preparación de un bioconjugado con albúmina. El grupo reactivo de maleimida y el grupo reactivo de piridina-2-il-disulfanilo reacciona con la funcionalidad SH de la cisteína 34 de la albúmina.

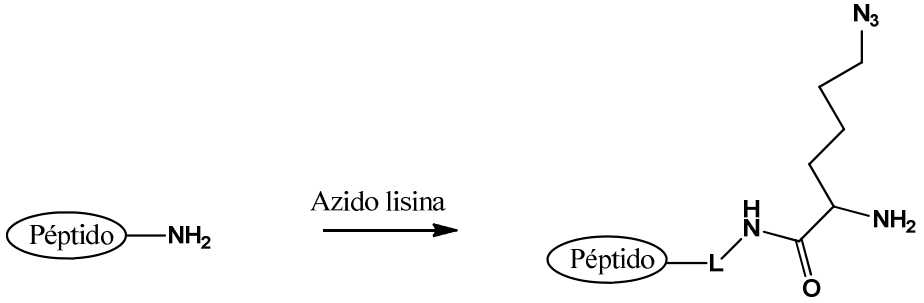
Los esquemas 3D y 3E describen la preparación de constructos péptido-enlazador para uso en una cicloadición de Huisgen azida alquino, más comúnmente conocido como química click.



(3Da)

Esquema 3D

en donde m es 0 o 1, C1 es un sistema de anillo carbocíclico o heterocíclico, mono, di o tricíclico opcionalmente sustituido con flúor, L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en el que la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= O), y en el que uno o más carbono se sustituye con O o NH. Las fracciones de cicloalquino (3DA) están fácilmente disponibles en el mercado. Además, el alquino cíclico en la química clic para el etiquetado de proteínas ha sido descrito en EE.UU. 2009/0068738, que se incorporan en la presente como referencia. Ejemplos específicos se han descrito a continuación (ejemplo 20). La manija clic puede ser introducida en el extremo N-terminal del péptido o en una cadena lateral de residuos de lisina.

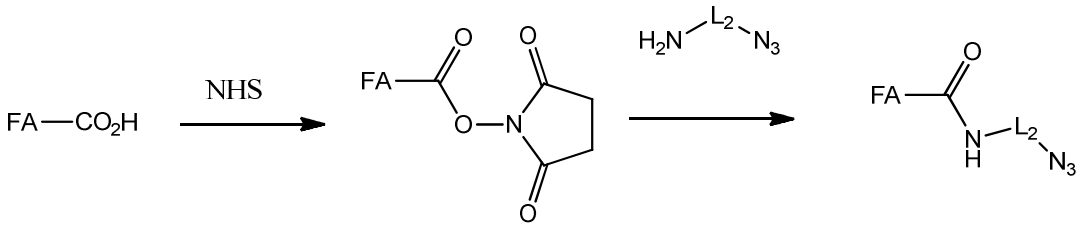


Esquema 3E

El esquema 3E describe la introducción de un residuo de lisina azido en el extremo N-terminal de un péptido de apelina opcionalmente a través de un enlazador L (tal como por ejemplo uno o más aminoácidos seleccionados entre glicina y serina). La funcionalidad azida actúa como una manija química. Ejemplos específicos se han descrito en esta solicitud co-presentada, (Número de expediente PAT055418-US-PSP2).

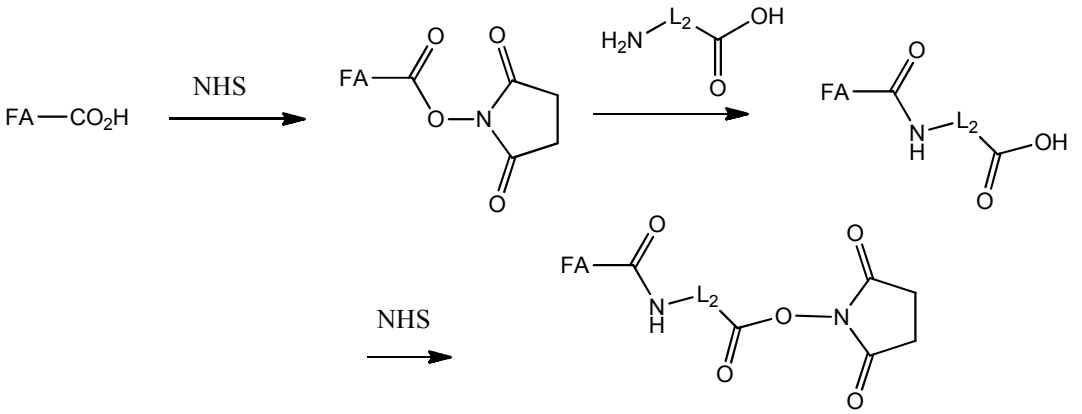
Preparación de constructo fracción-enlazador de extensión de vida media:

El Esquema 3F y 3G describe la preparación de un constructo de ácido graso-enlazador.



Esquema 3F

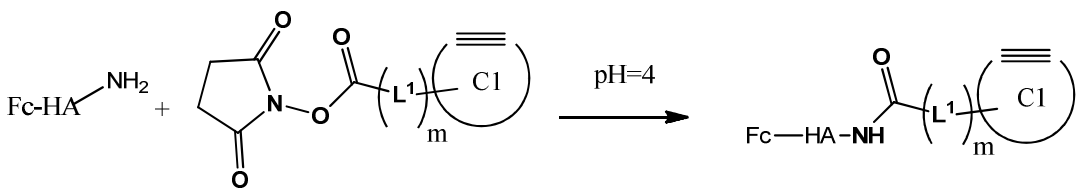
en donde FA es ácido graso, L2 es una fracción enlazadora(por ejemplo PEG), NHS es N-hidroxisuccinimida. Tales constructos de ácido graso- enlazador se utilizan para la conjugación utilizando química click. En los casos en donde el ácido graso contiene funcionalidades tales como grupos hidroxilo o ácido carboxílico adicional, puede ser necesaria la protección de dichas funcionalidades.



Esquema 3G

En donde FA, NHS y L2 se definen anteriormente en el Esquema 3F. Tales constructos de ácidos grasos se utilizan para la conjugación con una funcionalidad amino en el péptido, preferiblemente el extremo N-terminal.

El Esquema 3H describe la preparación de un constructo Fc-enlazador



Esquema 3H

AH-Fc es un constructo que contiene la secuencia AH- en el extremo N-terminal de la Fc. El constructo se prepara usando métodos recombinantes. La secuencia AH permite la modificación selectiva del extremo N-terminal a un pH bajo. Dicha modificación selectiva se divulga en solicitudes co-presentadas (solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015868: número de expediente PAT056275-US-PSP y solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015862: PAT056274-US-PSP). Por lo tanto, el clic mango se introduce en el extremo N-terminal del constructo Fc.

En aún otra realización, el constructo Fc se modifica en el extremo C para introducir un pequeño motivo de reconocimiento de sortasa (LPXTG/A).

Tal motivo de reconocimiento Fc se prepara usando métodos recombinantes. Un ejemplo de tal constructo es: Fc-[GGGG]n-LPETGGLEVLFQGP (SEQ ID NO: 15) en donde el péptido GGLEVLFQGP (SEQ ID NO: 16) es cortado durante el tratamiento con sortasa.

Preparación de la Proteína de Fusión de Péptidos Fc APJ

La molécula multimerizada biológicamente generada, tal como un anticuerpo Fc que comprende al menos una parte de la región que contiene cisteína conocida como la bisagra puede prepararse a partir del producto de proteína expresado recombinante que se ha secretado en forma multimerizada (por ejemplo, dimérica). La presente invención también incluye proteínas de fusión Fc modificadas en donde la secuencia de aminoácidos de la región Fc se ha alterado con respecto a la secuencia de aminoácidos de la región Fc-o constante encontrada en un anticuerpo de origen natural. Por ejemplo, la proteína de fusión Fc puede ser modificada con mutaciones con el fin de obtener las características deseadas de afinidad de unión a FcRn y/o vida media en suero. Ejemplo de proteínas de fusión Fc modificadas se han descrito en la patente de EE.UU. número 7.217.798, que se incorpora como referencia.

Las proteínas de fusión Fc de esta invención también se pueden alterar sintéticamente, por ejemplo, por unión de la fracción enlazadora y la fracción de péptido o polipéptido. Además, las proteínas de fusión Fc "modificadas" con dominio Fc derivadas de anticuerpos recombinantes se pueden hacer en cualquier sistema de expresión incluyendo sistema de expresión procariota y eucariota o el uso de métodos de presentación de fagos.

Los constructos Fc-enlazador tales como Fc-[GGGGS] (SEQ ID NO: 14), Fc-[GGGGS]2 (SEQ ID NO: 13), Fc-[GGGGS]3 (SEQ ID NO: 12), Fc-GG y Fc-GS, se describen a continuación en la parte experimental. El [GGGGS] (SEQ ID NO: 14), [GGGGS]2 (SEQ ID NO:13), [GGGGS]3 (SEQ ID NO:12), GS y enlazador GG están unidos ya sea al extremo C del dominio Fc o al extremo N del dominio Fc, en donde Fc es un Fc nativo o una variante del mismo. Ejemplo de la variante Fc incluye un Fc en el que la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina. Tal variante Fc se han descrito en esta solicitud co-presentada, (Número de expediente PAT055781-US-PSP2).

Bioconjugados

En una realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV se conjuga (se fija químicamente / covalentemente) a la funcionalidad tiol de la cisteína 34 de la albúmina. En un aspecto de esta forma de realización, albúmina-péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina se conjuga (se une químicamente) al extremo N-terminal del péptido. En aún otra realización, albúmina-péptido se refiere a un bioconjugado en el que la albúmina se conjuga (se une químicamente) al extremo C-terminal del péptido.

En otra forma de realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de la Fórmula I a IV se fusiona a uno o más dominios de una región Fc de la IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se fija a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está involucrado en las funciones efectoras, como la activación del complemento y el ataque de las células fagocíticas. Un Fc tiene una larga vida media sérica, mientras que un Fab tiene una vida corta (Capon , 1989, Nature 337: 525-31). cuando se unen

(con un péptido o polipéptido terapéutico, un dominio Fc puede proporcionar vida media más larga (C. Huang, Curr. Opin. Biotechnol., 2009, 20, 692-699).

En una realización, el péptido Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo N-terminal del péptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I a IV. En otra realización, el péptido-Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo C del péptido.

La región Fc puede ser una región Fc de origen natural, o se puede modificar para mejorar ciertas cualidades, como las cualidades terapéuticas, el tiempo de circulación, o la agregación reducida.

Modificaciones útiles de los agentes terapéuticos por fusión con el dominio "Fc" de un anticuerpo son discutidos en detalle en la Publicación PCT No. WO 00/024782. Este documento discute la unión a un "vehículo" tal como glicol de polietileno (PEG), dextrano, o una región Fc.

Las realizaciones preferidas de la invención son bioconjugados que comprenden un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones anteriores y una fracción de extensión de vida media, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc fusionado a un polipéptido de la Fórmula I, III, IV o V a través un enlazador. En un aspecto de esta invención, el enlazador tiene la siguiente fórmula:

- [GGGGS] n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 7) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural. Ejemplos de polipéptidos de la Fórmula I, II, III o IV adecuado para la fusión con el dominio Fc son: QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO:8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO:9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO:10). Un aspecto preferido de esta realización son péptidos Fc bioconjugados fusionados como se define anteriormente, que comprende un fragmento Fc modificado (por ejemplo, un FcLALA) y un péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV, como se define en la presente.

En aún otra realización, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisana del extremo C ha sido eliminada o sustituida por alanina.

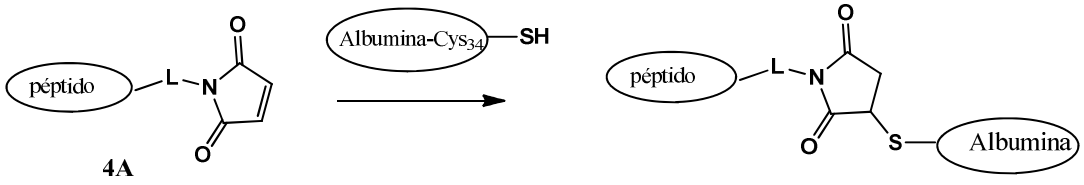
Se ha encontrado que los péptidos fusionados a una región Fc exhiben una vida media sustancialmente mayor in vivo que sus contrapartes sin fusionar. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido.

En otras realizaciones de la invención están los bioconjugados que comprende un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas I-IV y una fracción de extensión de vida media, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que se une químicamente a un polipéptido.

Preparación de Conjugados:

Los esquemas 4 y 5 ilustran las reacciones químicas para la conjugación de un péptido agonista de APJ o un péptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IV y una fracción de extensión de vida media, tales como un dominio Fc o albúmina.

El esquema 4 ilustra la conjugación de un péptido enlazador de la Fórmula 4A con cisteína 34 de albúmina

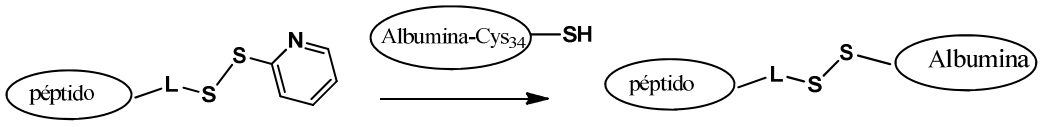


4A

Esquema 4

en donde L representa una fracción enlazadora entre el péptido y la funcionalidad de maleimida. En una realización particular, L es una fracción enlazadora como se divulgó en el Esquema 1, 3A, 3B o 3C.

El esquema 5 ilustra la conjugación de un constructo péptido enlazador de la Fórmula 8A con cisteína 34 de albúmina

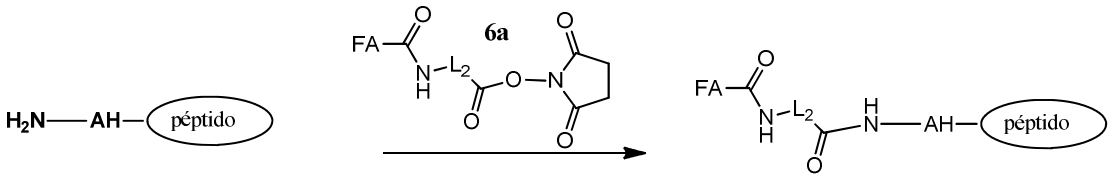


5A

Esquema 5

en donde L representa una fracción enlazadora entre el péptido y la funcionalidad –S-S-piridina. En una realización particular, L es una fracción enlazadora como se divulgó en los Esquemas 2, 3A, 3B o 3C.

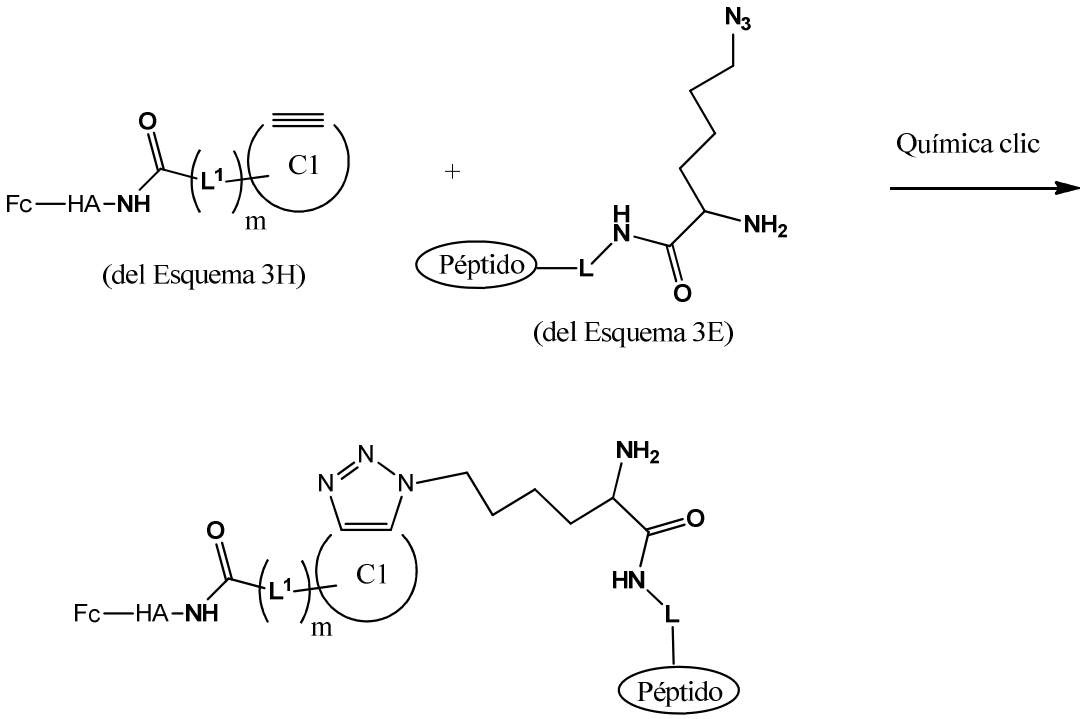
Otro método de conjugación se ha descrito en la solicitud co-pendiente y co-presentada (solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015862: números de expediente PAT056274-US-PSP, solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015868: PAT056275-US-PSP y solicitud provisional de EE.UU. No. 62/015848: PAT055781-US-PSP02). Tal método incluye N-acilación selectiva de un péptido y se resume en el Esquema 6.



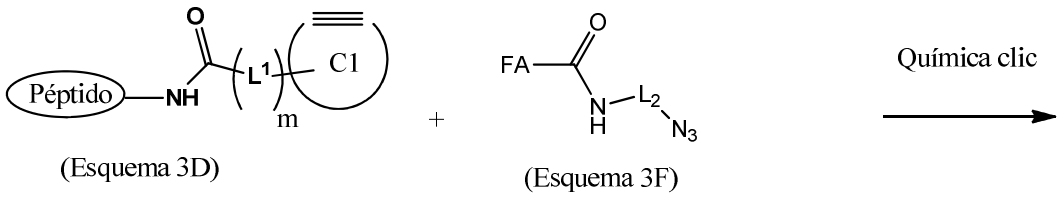
Esquema 6

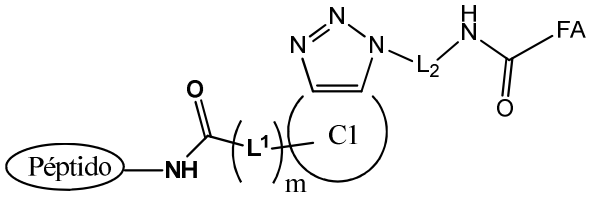
en donde AH es un enlazador introducido en el extremo N del péptido para facilitar la reacción en el extremo N-terminal, H es histidina, A es alanina, FA es un ácido graso como se describió anteriormente, por ejemplo, un ácido graso de la fórmula A1 a A3 , y L es una fracción enlazadora (por ejemplo, una fracción enlazadora PEG). El constructo 6a de ácido graso-enlazador (preparado como se muestra en el Esquema 3G) se introduce selectivamente en el péptido en el extremo N-terminal cuando se utilizan condiciones de pH bajo. Dicho método se ha descrito en solicitudes de patentes co-presentadas (solicitud provisional EE.UU. No. 62/015868: número de expediente PAT056275-US-PSP y solicitud provisional EE.UU. No. 62/015848 PAT055781-US-PSP02).

Los esquemas 7 y 8 describen la formación de conjugados de acuerdo con la presente invención usando química clic.



Esquema 7



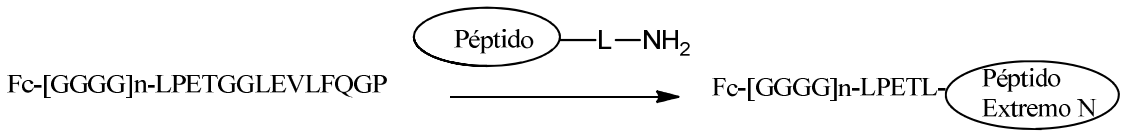


Esquema 8

Los métodos para preparar conjugados y constructos péptido-enlazador en los Esquemas 1-5 También se han descrito y ejemplificado en solicitudes EE.UU. co-presentadas (solicitud provisional de EE.UU. No. 61/858 251: números de expediente: PAT055326-US-

PSP3 y solicitud provisional de EE.UU. No. 61/858303:PAT055781-US-PSP) que se incorporan en la presente como referencia.

El esquema 9 describe la conjugación de un péptido APJ con un constructo Fc que utiliza una enzima de sortasa



en donde n es 1, 2 o 3, L es un enlazador opcional es (por ejemplo un enlazador de poliglicina)

(SEQ ID NOS 17 y 11, respectivamente, en orden de aparición)

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, pueden administrarse en cualquiera de una variedad de maneras, incluyendo por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por inhalación, por vía oral, etc. Las realizaciones particularmente preferidas de la invención emplean la administración intravenosa continua de los polipéptidos de la presente invención, o una amida, éster, o sal del mismo o un bioconjugado de los mismos. Los polipéptidos o bioconjugados de la presente invención se pueden administrar como un bolo o como una infusión continua durante un período de tiempo. Se puede utilizar una bomba implantable. En ciertas realizaciones de la invención, la administración intermitente o continua de polipéptidos o bioconjugados se continúa durante uno o varios días (por ejemplo, 2-3 o más días), o por períodos más largos de tiempo, por ejemplo, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido se proporciona durante al menos 3 días aproximadamente. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido o bioconjugado se proporciona durante al menos una semana aproximadamente. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua del polipéptido o bioconjugado se proporciona durante al menos dos semanas aproximadamente. Puede ser deseable mantener una concentración plasmática promedio del polipéptido por encima del valor del umbral determinado, ya sea durante la administración o entre la administración de dosis múltiples. Una concentración

deseable se puede determinar, por ejemplo, sobre la base de la condición fisiológica del sujeto, gravedad de la enfermedad, etc. dichos valores deseables se pueden identificar mediante la realización de ensayos clínicos estándar. Alternativamente, los peptidos y conjugados de los mismos pueden entregarse por vía oral a través de un mecanismo FcRn. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262–G270, 2013).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la presente invención o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado de los mismos, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede formularse para rutas particulares de administración tales como administración oral, administración parenteral, y administración rectal, etc. Además, la composiciones farmacéuticas del presente invento pueden integrarse en una forma sólida (incluyendo sin limitación cápsulas, tabletas, píldoras, gránulos, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo sin limitación soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como ésterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes lubricantes, o agentes amortiguadores, así como también adyuvantes, tales como preservativos, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores y buffers, etc.

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

Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) o tampón de fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista fácil inyectabilidad. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben preservar con la acción de contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol de propileno, y glicol de polietileno líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse por ejemplo, mediante el uso de un cubierta tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de particula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La

prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios son ventajosamente preparados a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden ser ésterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes preservantes, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o buffers. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones son preparadas según métodos convencionales de mezclado, granulación o revestimiento, respectivamente, y contienen 0.1-75% aproximadamente, o contienen 1- 50% aproximadamente, del ingrediente activo.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de ésterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución estéril previamente filtrada de los mismos.

Composiciones orales generalmente 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 utilizar en la forma de comprimidos, grageas, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un vehículo de flujo para utilizar como un enjuague bucal. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas 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 agtente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o estearatos; un deslizante como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa y/o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Formulaciones para adminstración oral pueden ventajosamente incorporar agentes para mejorar estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/ o para mejorar la absorción.

Para administración por inhalación, los agentes terapéuticos inventivos son preferiblemente liberados en la forma de un espray en aerosol a partir de un contenedor presurizado o dispensador que contiene un propelente apropiado, ej., un gas tal como dioxido de carbono, o un nebulizador. Se nota que los pulmones proporcionan una gran superficie de área para administración sistémica de agentes terapéuticos.

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

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos.

Composiciones apropiadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un polipéptido de la invención con un vehículo apropiado. Vehículos apropiados para liberación transdérmica incluyen solvatos farmacológicamente aceptables absorbentes para asistir en el pasaje a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en la forma de un vendaje que comprende un miembro de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera controladora de tasa para liberar el compuesto de la piel del huésped a una tasa controlada y predeterminada durante un periodo de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

Composiciones apropiadas para aplicación tópica, *ej.*, a la piel y ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones en atomizador, *ej.*, para liberación mediante aerosol o similares. Tales sistemas tópicos de liberación serán apropiados en particular para aplicación dérmica. Por lo tanto son particularmente apropiados para utilizar en formulaciones tópicas incluyendo formulaciones cosméticas bien conocidas en el estado de la técnica. Tales pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes mejoradores de tonicidad, buffers y preservativos.

Como se utiliza en la presente una aplicación tópica también se refiere a una inhalación o a una aplicación intranasal. Estas pueden ser convenientemente liberadas en la forma de un polvo seco (bien sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o como partículas de componentes mixtos, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, atomizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente apropiado.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la tasa mediante la cual el compuesto del presente invento como un ingrediente activo se descompondrá. Tales agentes, los cuales se conocen en la presente como "estabilizadores," incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, buffers de pH, o buffers de sales, etc.

Tal como se utiliza en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de los polipéptidos de esta invención y, que normalmente no son biológicamente o de otro modo indeseables. En muchos casos, los polipéptidos de la presente invención son capaces de formar sales ácidas y/o alcalinas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, ej., sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/hidrobromuro, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfornato, cloruro/hidrocloruro, clorteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mielato, misilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de

hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y sales de trifluoroacetato.

Ácidos inorgánicos a partir de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido hidrobrómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

Ácidos orgánicos de tales sales pueden derivarse incluyendo, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maléico, ácido manólico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las Sales de adición alcalina farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

Bases inorgánicas a partir de las cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, sales y metales de amonio de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; sales particularmente apropiadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Bases orgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de ocurrencia natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio de iones alcalinos, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen esopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir de un compuesto precursor, una fracción alcalina o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse al reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tales como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K o similares), o al reaccionar formas alcalinas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Típicamente, tales reacciones se realizan en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, el uso de medios no acuosos tipo éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo es deseable, donde pueda realizarse. Listas de sales apropiadas adicionales pueden encontrarse, ej., en "*Remington's Farmaceutical Sciences*", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "*Handbook of Farmaceutical Salts:*

Properties, Selection, and Use" de 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, surfactantes, antioxidantes, preservativos (ej., agentes antibacterianos , agentes antimicóticos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, preservativos, fármacos, fármacos estabilizadores, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, edulcorantes, agentes sapófiros, tintes, y similares y combinaciones de los mismos, como se conocerá por aquellos con experiencia en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Excepto en lo que respecta a cualquier vehículo convencional incompatible con el ingrediente activo, su uso es contemplado en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Método de la Invención:

La familia de apelina de peptidos es la única familia natural conocida de ligados para el receptor APJ acoplado a proteína G. El gen de Apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, el cual se transforma en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12 y una forma modificada de la apelina-13 con piroglutamato (Pyr^1-apelina-13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, tras la unión al receptor APJ, se transduce la señal a través de proteínas Gi y Gq. En cardiomiocitos, el acoplamiento Gi o Gq conduce a cambios en el pH intracelular, la activación de PLC, y la producción de IP3 que mejoran la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y en última instancia resulta en aumento de la contractilidad cardiaca. El acoplamiento Gi inhibe el Gs activado, la adenilato ciclasa y la producción de cAMP y aumenta los niveles pAkt que conducen a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, la activación de APJ a través de Gi, pAKT conlleva a la producción aumentada de óxido nítrico (NO), que aumenta el relajamiento del músculo liso que resulta en vasodilatación generalizada.

Los pacientes con insuficiencia cardiaca crónica estable tienen episodios agudos de descompensación ocasionales, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más y los síntomas empeoran. Estas exacerbaciones se conocen como la insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD). Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos,

vasodilatadores e inotrópicos, que aumentan directamente la contractilidad cardíaca. Inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendan) son bien conocidos por sus efectos adversos tales como arritmias y mortalidad a largo plazo aumentada. Análogos sintéticos del polipéptido apelina de la presente invención, o bioconjugado de los mismos, proporcionan una terapia para la falla cardiaca aguada descompensada (ICAD) que incrementa la contractilidad cardíaca sin complicaciones arritmogénicas o mortalidad y apunta a una enorme necesidad médica en la insuficiencia cardíaca crónica.

De hecho, el tratamiento agudo apelina (5 min) en seres humanos resultados en la vasodilatación coronaria y mejora el gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben un t ½ muy corto (segundos) y la duración de la acción (pocos minutos) in vivo. Análogos potentes sintéticos del polipéptido Apelina de la presente invención, o bioconjugado de los mismos, tienen una vida media más larga en comparación con la apelina nativa.

La activación del receptor APJ en cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardiaca a través de Gi / Gq, PLC y Ca2 +, y b) proporciona cardioprotección a través de Gi, la activación pAkt, pero sin aumentar el cAMP (como se ve con otros inotrópicos). Además, el agonismo APJ en las células endoteliales conduce a la vasodilatación arterial, que beneficia adicionalmente a la insuficiencia cardíaca sin sobre cargar el ventrículo izquierdo. Tomados en conjunto los análogos sintéticos del polipéptido Apelina pueden mejorar la función cardíaca general, reducir la arritmogénesis y proporcionar un beneficio de supervivencia.

Más recientemente, ha habido un número de publicaciones de investigación preclínicas centradas en la posible participación de la apelina en la diabetes y la resistencia a la insulina. La apelina ha demostrado que 1) baja los niveles de glucosa en la sangre mediante la mejora de la captación de glucosa en el músculo, tejido adiposo y corazón, 2) protege a las células beta pancreáticas del estrés ER y apoptosis posterior, 3) disminuye la secreción de insulina en las células beta, y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en el tejido adiposo. La activación de la vía de pAKT ha sido implicada en estos procesos.

Los polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, o un bioconjugado de los mismos, exhiben propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor de APJ, por ejemplo, como se indica en

las pruebas in vitro e in vivo como se dispone en las siguientes secciones y por lo tanto se indican para terapia.

Los polipéptidos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o bioconjugados de los mismos, pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, la fibrosis cardiaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), la obesidad, la enfermedad arterial periférica, los accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, las lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol) y la preeclampsia.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para el tratamiento de una enfermedad que se asocia con la actividad del receptor APJ. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista antes mencionada, apropiadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda. En aún otro subconjunto de esta realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de una enfermedad que se asocia con la actividad del receptor APJ.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que puede ser tratada mediante la activación (agonista) del receptor de APJ.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que responde al agonismo del receptor de APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo. En una

realización adicional, la enfermedad se selecciona de la lista antes mencionada, adecuadamente insuficiencia cardíaca descompensada aguda.

En aún otro subconjunto de esta realización, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad que responde al agonismo del receptor APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

La cantidad eficaz de una composición o combinación farmacéutica de la invención a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento por lo tanto variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, de la indicación para la que se está utilizando la variante de proteína de fusión, la vía de administración, el peso y el tamaño (cuerpo , superficie corporal, o tamaño del órgano) y condición (la edad y salud general) del paciente. En consecuencia, el médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede oscilar entre 0,1 µg/kg hasta aproximadamente100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación pueden oscilar entre 0.1 µg/kg y 100 mg/kg aproximadamente; o 1 µg/kg hasta 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de función dual en la formulación que se utiliza. Por lo general, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación para lograr el efecto deseado. La composición por lo tanto, se puede administrar como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implante o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación adecuada es realizado de manera rutinaria por los expertos en el estado de la técnica y se encuentra dentro del ámbito de las tareas de rutina realizadas por ellos. Las dosis apropiadas se pueden determinar a través del uso de datos apropiados dosis-respuesta.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un polipéptido de la presente invención o un bioconjugado del mismo, se refiere a una cantidad del polipéptido de la presente invención (o bioconjugado) que producirá la respuesta biológica o médica de un

sujeto, por ejemplo, mejora de un síntoma, alivio de una condición, retardo o disminución la progresión de la enfermedad, o prevención de una enfermedad, etc. En una realización 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) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una condición, o un trastorno o una enfermedad o un síntoma de la misma (i) aliviada por la activación del receptor APJ, o (ii) asociada con actividad del receptor APJ, o (iii) caracterizada por actividad anormal del receptor APJ; o (2) activar el receptor APJ.

En otra realización 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, tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es eficaz, al menos parcialmente activar el receptor APJ. Como se preciará por los expertos en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que es efectiva puede variar dependiendo de tales factores como el fin biológico deseado, el agente a ser liberado, el tejido diana, etc. Aquellos con experiencia común en la técnica entenderán que “una cantidad terapéuticamente efectiva” puede administrarse en una única dosis o puede lograrse mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar insuficiencia cardiaca, una cantidad efectiva puede ser una cantidad suficiente para resultar en la mejora clínica del paciente, ej., tolerancia/capacidad de ejercicio aumentada, presión sanguínea aumentada, retención de fluidos disminuida, y/o resultados mejorados en una prueba cuantitativa del funcionamiento cardiaco, ej., la fracción expulsada, capacidad de ejercicio (tiempo hasta estar 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 a por ejemplo, primates (*ej.*, humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En aún otras realizaciones, el sujeto es un humano.

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

Como se utiliza en la presente, el término “tratar”, o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es

decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización “tratar” o “tratamiento” se refiere a aliviar o mejorar al menos parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (*ej.*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (*ej.*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, “tratar” o “tratamiento” se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en la presente, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la prevención de la recurrencia, comienzo, o desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resulta de la administración de una terapia (ej., un agente terapéutico), o la administración de una combinación de terapias (ej., una combinación de agentes terapéuticos).

Como se utiliza en la presente, un sujeto esta “en necesidad de” un tratamiento si tal sujeto se beneficia biológicamente, médicamente o mejora su calidad de vida a partir de tal tratamiento.

Como se utiliza en la presente, el término "un,” "una,” "el”, “los” y términos similares se utilizan en el contexto del presente invento (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) para cubrir formas tanto singulares como plurales a menos que se indique lo contrario o claramente sea contradicho por el contexto.

Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.,* "tal como”) proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor el invento y no implica limitación sobre el alcance del invento de otra manera reivindicado.

La actividad de un polipéptido según la presente invención puede evaluarse mediante los siguientes métodos *in vitro & in vivo* descritos más adelantes.

Ensayo de flujo de calcio de hAPJ:

Se sembraron células estables Chem.-5 de APJ (Millipore # HTS068C) en un placa de 384 pozos con 10.000 células / pozo en 25 µl de medio de cultivo, luego se cultivaron durante 24 horas en una incubadora de tejido a 37 ° C. Una hora antes del ensayo, se agregó 25 µl /

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 tejidos a 37 °C. Los péptidos se disolvieron en HBSS, HEPES y buffer BSA al 0,1%, y se diluyeron serialmente 10 veces, desde 50 uM hasta 5 pM por triplicado. Se utilizó Tetra FLIPR para agregar péptido a las células con colorante (1:5, para concentraciones peptidicas finales que van desde 10 uM a 1 pM). El tinte FLIPR dentro de las células emite fluorescencia tras la unión al calcio, mientras que la fluorescencia de fuera de las células es enmascarada. La fluorescencia se midió utilizando ondas de longitud de 470-495 de excitación y 515 a 575 de emisión en el FLIPR Tetra. Las lecturas se realizaron durante 3 minutos en total, comenzando 10 segundos antes de la adición de péptidos. Se calcularon los valores máximos y mínimos y se representaron gráficamente para cada concentración de péptido, y el software GraphPad prism se utilizó para calcular los valores EC_{50} en los puntos de inflexión de la curva, para la estimulación de flujo de calcio por péptidos.

Ensayo de la estabilidad del plasma:

Materiales:

Solución de Trabajo: El objeto de la muestra se preparó a 1 mg / ml en agua Milli-Q

Extraction solution: Metanol: Acetonitrilo: Agua (1:1:1) con ácido Fórmico al 0,1% y 400 ng / ml de Gliburida.

Plasma: El plasma de ratas Sprague-Dawley macho (con heparina de sodio), comprado de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York).

Sangre entera: Sangre entera de Sprague-Dawley macho (con heparina de sodio), comprado de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York).

Homogeneizado de Pulmón: El pulmón de ratas Sprague-Dawley macho se compró de Bioreclamation LLC (Liverpool, Nueva York). El pulmón se homogeneizó utilizando un homogeneizador Polytron después de la adición de 5x el volumen de 1X PBS. El homogenato se centrifuge a 9000 rpm durante 10 min at 4 °C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 30 min para hacer un sobrenadante claro. La concentración de proteína se determinó utilizando un kit comercial (Pierce, Thermo Scientific).

Muestra del procedimiento de preparación: (péptidos)

El artículo de prueba se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: El plasma de rata heparinizada, sangre entera heparinizada o homogeneizado de pulmón de rata. La muestra de plasma y sangre entera se preparó a 5000 ng / ml mediante la adición de 5 µl de la solución de Trabajo de 1 mg / ml a 995 ul de plasma de rata o de sangre entera.

Muestras de homogeneizado de pulmón se prepararon mediante la dilución del homogeneizado de pulmón a 1 mg / ml de concentración de proteína con un tampón fosfato de salino (PBS), seguido de la adición de solución de 5 uL a la solución de Trabajo a 995 uL de homogeneizado de pulmón diluido.

Las muestras se incubaron a 37 º C con una agitación suave (65 ~ 75 rpm) en un incubador de baño de agua. En los tiempos 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 y 240 min, 25 uL alícuotas de muestras de incubación se transfirieron a placas de 96 pocillos e inmediatamente se precipitó proteína usando 150 uL de solución de extracción. Después de la terminación del experimento de incubación, la placa de la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 º C durante 10 minutos. Posteriormente, se utilizó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y agregar 50 µl de agua para todas las muestras. La placa se agitó en un vórtex antes del análisis LC-MS.

Muestra del procedimiento de preparación (Conjugados):

El artículo de prueba se preparó a 50.000 ng / ml mediante la adición de 5 ul de la solución de Trabajo de 1 mg / ml a 495 µl del plasma de rata. Las muestras se incubaron a 37º C con agitación suave (65 ~ 75 rpm) en un incubador de baño de agua. A las 0hr, 0.5 hr, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 y 24 horas, 50 µL de alícuotas de muestras de incubación se transfirieron a la placa de 96 pozos y se agregaron 100 uL 40 mM TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) a cada muestra. La mezcla de reacción se incubó a 37 º C durante 1 hora. Después de la terminación de la reacción, la precipitación de proteínas se realizó utilizando 300uL de acetonitrilo. La placa de la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 º C durante 10 minutos. Posteriormente, se utilizó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir 125 uL de sobrenadantes a otra placa y agregar 50 µl de agua a todas las muestras. La placa se agitó en un vórtex antes del análisis LC-MS.

Muestras del análisis LC-MS de estabilidad

HPLC: Agilent 1290 HPLC con automuestreador

Columna: MAC-MOD ACE C18, 3 µm, 30mm x 2.1mm i.d.

Mobile phase A: Ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

Fase móvil B: Ácido fórmico al 0,1% 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: Análisis completo con rango de masas de 100-1000 m / z

Adquisición y análisis de datos de software: MassHunter

Análisis de Datos:

Ensayo de estabilidad: Estabilidad de la vida media, (t ½), se determinaron los valores mediante la conversión de áreas de los picos en cada punto de tiempo porcentaje relativo permanente al área del pico inicial (t = 0).

Porcentaje restante = 100 x (área del pico de la muestra) ÷ (t = 0 área del pico)

El logaritmo natural de los valores de porcentaje restantes se calcularon y se representaron gráficamente versus el tiempo de la muestra (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó por regresión lineal (Microsoft Excel).

La estabilidad de la vida media se calculó por la fórmula, t ½ = 0,693 ÷ k

Ensayo de estabilidad del plasma basado en la actividad sustituta:

El protocolo de flujo de calcio descrito anteriormente fue seguido, con los siguientes cambios. Los péptidos también se incubaron con plasma de rata al 5% (Bioreclamation # RATPLNAHP-M, tratada con heparina Na). Las lecturas se tomaron en puntos de tiempo de

t_0 y t_{24} horas, después de la incubación en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 ° C. Se estimo la vida media plasmática peptidica en minutos mediante el cálculo de lo siguiente:

1) LN((EC_{50} at t_0)/ (EC_{50} at $t_{24\ hrs}$)),

2) Calcular la pendiente del valor anterior y

3) $t_{1/2}$ = 0.693/(pendiente^2).

Usando el ensayo de prueba (como se describió anteriormente), los polipéptidos de la invención mostraron eficacia yestabilidad de acuerdo a las Tablas 2 y 3, proporcionadas a continuación.

TABLA 2 Actividad y Estabiliad de los Polipéptidos

Péptido	**hAPJ Ca^{2+} Flux EC_{50} [nM]**	**Estabilidad del plasma basado en la actividad sustituta: t½ [min]**
Ejemplo 1	9.4	8
Ejemplo 2	3.2	39
Ejemplo 3	64.5	N.D.
Ejemplo 4	74.6	506
Ejemplo 5	1.6	5.0
Ejemplo 6	21.4	5
Ejemplo 7	11.8	9
Ejemplo 8	13.1	662.5
Ejemplo 9	23.4	109.2
Ejemplo 10	46.9	57.4
Ejemplo 11	32.2	32.8
Ejemplo 12	21.4	10
Ejemplo 13	12.2	10
Ejemplo 14	48.7	7.5

Ejemplo 15	193.5	17.7
Ejemplo 16	14.1	7
Ejemplo 17	410.3	11.4
Ejemplo 18	174	50
Ejemplo 19	79.3	50
Ejemplo 20	1.0	11.9
Ejemplo 21	2.9	>1000
Ejemplo 22	3.3	>1000
Ejemplo 23	72.2	3157
Ejemplo 24	85.8	1699
Ejemplo 25	227	>1000
Ejemplo 26	2292	52
Ejemplo 27	86.5	82
Ejemplo 28	3.1	13
Ejemplo 29	4.2	705.0
Ejemplo 30	0.4	660.7
Ejemplo 31	0.5	43.1
Ejemplo 32	3.0	>1000
Ejemplo 33	1.9	>1000
Ejemplo 34	0.6	>1000
Ejemplo 35	2.0	155.0
Ejemplo 35	66.7	8
Ejemplo 36	4.2	34
Ejemplo 37	937	47
Ejemplo 38	175	41
Ejemplo 40	2479	>1000
Ejemplo 41	839	>1000
Ejemplo 42	16.3	>1000
Ejemplo 43	28.9	>1000
Ejemplo	1.8	5.0

Comparativo: Pyr1-apelina-13		

TABLA 3 Correlación entre el Ensayo de Estabilidad Plasmática y el Ensayo de Estabilidad Plasmática Basado en Actividad Suplente

Péptido	**Estabilidad plasmática t½ [min]**	**Estabilidad plasmática basada en actividad suplente t½ [min]**
Pyr-1-Apelina 13	6.6	5.0
Ex 32	377	>1000

El polipéptido de la presente invención o bioconjugados del mismo puede tener una potencia del receptor APJ similar a apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización el polipéptido de la presente invención o bioconjugado del mismo tiene un EC_{50} menor que 100nM. En otra realización el polipéptido de la invención, o bioconjugado del mismo, tiene un EC_{50} menor que 50nM, preferiblemente menor que 25nM y más preferiblemente menor que 15nM. En aún otra realización, el polipéptido de la presente invención o bioconjugado tiene un EC_{50} menor que 10nM.

El polipéptido de la presente invención, o bioconjugado del mismo, puede tener una estabilidad plasmática superior a apelina-13 o pir-1-apelina-13. En una realización, la mejoría en estabilidad plasmática es al menos de dos veces. En una realización, el polipéptido de la invención, o un bioconjugado del mismo, tiene una estabilidad plasmática de al menos 30 minutos. En otra realización, el polipéptido de la invención, o un bioconjugado de los mismos, tiene una estabilidad plasmática de al menos 60 minutos, o al menos 80 minutos, preferiblemente al menos 100 minutos y más preferiblemente al menos 150 minutos.

El polipéptido de la presente invención, o un bioconjugado del mismo, puede administrarse bien sea simultáneamente con, o antes de o después de, uno o más agentes terapéuticos. El polipeptido o bioconjugado de la presente invención pueden administrarse de manera separada, mediante la misma o diferente ruta de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica como los otros agentes.

En una realización, el invento proporciona un producto que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster de una sal del mismo, o un biconjugado del mismo y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultaneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición sensible a la activación del receptor APJ.

Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, y el otro agente terapéutico juntos en la misma composición farmacéutica, o un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, y el otro agente terapéutico en forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo y otro agente terapéutico. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describió anteriormente.

En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo. En una realización, el kit comprende medios para retener de manera separada dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida, o empaque dividido en aluminio. Un ejemplo de tal kit es paquete blister, como el que típicamente se utiliza para empacar tabletas, cápsulas y similares.

El kit del invento puede utilizarse para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las diferentes composiciones entre sí. Para ayudar en

el cumplimiento terapéutico, el kit del invento típicamente comprende pautas para administración.

En las terapias de combinación del invento, el péptido o bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico puede fabricarse y/o formularse por los mismos o diferentes fabricantes. Además, el péptido o bioconjugado del invento y el otro agente terapéutico serán llevados juntos en una terapia de combinación: (i) antes de entregar el producto de combinación a los médicos (*ej.* en el caso de un kit que comprende el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la pauta del médico) poco antes de administración; (iii) en los pacientes mismos, *ej.* durante la administración secuencial del polipéptido o bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico.

Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el medicamento se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor de apelina, en donde el medicamento se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IX o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un bioconjugado del mismo, para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o bioconjugado del mismo, se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor de apelina, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo. La invención también proporciona un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un

éster o una sal del mismo, o bioconjugado del mismo, se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el otro agente terapéutico se administra con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

La invención también proporciona el uso de un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente ha sido previamente tratado (ej, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente se ha tratado anteriormente (ej., dentro de las 24 horas) con un polipéptido de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo.

En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-CO-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de la aldosterona, bloqueadores de receptores de la endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y un inhibidor de NEP.

El término “en combinación con” un segundo agente o tratamiento incluye co-administración del polipéptido o bioconjugado de la invención (*ej.*, un polipéptido según cualquiera de las fórmulas I-IV o un polipéptido de otra manera descrito en la presente) con el segundo agente o tratamiento, la administración del compuesto de la invención primero, seguido por el segundo agente o tratamiento y administración del segundo agente o tratamiento primero, seguido por el compuesto de la invención.

El término “segundo agente” incluye cualquier agente que se conoce en la técnica para tratar, prevenir o reducir los síntomas de una enfermedad o trastorno descrito en la presente, *ej.* .un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, tal como por ejemplo, insuficiencia cardiaca aguda descompensada(ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular,

aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquemicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

Ejemplos de segundos agentes incluyen inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-CO-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de la aldosterona, bloqueadores de receptores de la endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y/o un inhibidor de NEP.

Inotropos como se utilizan en la presente incluyen por ejemplo dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendan, epinefrina, norepinefrine, isoproterenol y digoxin.

Los bloqueadores de 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, Danaparoida, Enoxaparina, Heparina, Tinzaparina, Warfarina.

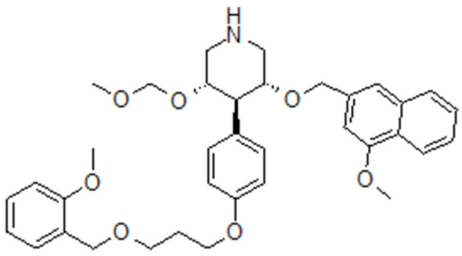
El término “inhibidores de la HMG-Co-A reductasa” (también llamado inhibidores de la beta-hidroxi-beta-metilglutaril-co-enzima-A reductasa) incluye agentes activos que pueden utilizarse para reducir los niveles de lípidos incluyendo el colésterol en la sangre. Ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina, rivastatina, simvastatina, y velostatina, o, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “inhibidor de la ACE” (también llamado inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina) incluye moléculas que interrumpen la degradación enzimática de angiotensina I a angiotensina II. Tales compuestos pueden utilizarse para la regulación de la presión sanguinea y para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril,

enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, y trandolapril, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

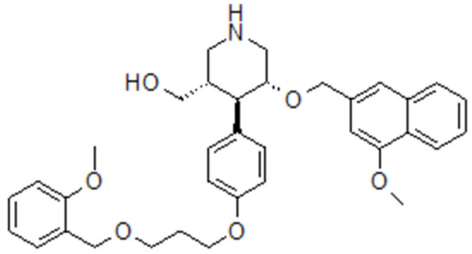
El termino "antagonista de endotelina" incluye bosentan (cf. EP 526708 A), tezosentan (cf. WO 96/19459), o, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "inhibidor de renina" incluya ditequiren (nombre químico: [1*S*-[1*R**,2*R**,4*R**(1*R**,2*R**)]]-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-L-prolil-L-fenilalanil-N-[2-hidroxi-5-metil-1-(2-metilpropil)-4-[[[2-metil-1-[[(2-piridinilmetil)amino]carbonil]butil]amino]carbonil]hexil]-*N*-alfa-metil-L-histidinamida); terlakiren (nombre químico: [*R*-(*R**,*S**)]-N-(4-morfolinilcarbonil)-L-fenilalanil-N-[1-(ciclohexilmetil)-2-hidroxi-3-(1-metiletoxi)-3-oxopropil]-S-metil-L-cisteineamida); Aliskiren (nombre químico: (2*S*,4*S*,5*S*,7*S*)-5-amino-*N*-(2-carbamoil-2,2-dimetiletil)-4-hidroxi-7-{[4-metoxi-3-(3-metoxipropoxi)fenil]metil}-8-metil-2-(propan-2-il)nonanamida) y zankiren (nombre químico: [1*S*-[1*R**[*R**(*R**)],2*S**,3*R**]]-*N*-[1-(ciclohexilmetil)-2,3-dihidroxi-5-metilhexil]-alfa-[[2-[[(4-metil-1-piperazinil)sulfonil]metil]-1-oxo-3-fenilpropil]-amino]-4-tiazolpropanamida), o sales de hidrocloruro del mismo, o, SPP630, SPP635 y SPP800 como se desarrolló por Speedel, o RO 66-1132 y RO 66-1168 of la Fórmula (A) y (B):



(A)

y



(B)

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

El término "alisquiren", si no está definido específicamente, se entiende tanto como la base libre y como una sal del mismo, especialmente una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, más preferiblemente una sal de hemi-fumarato del mismo.

El término "bloqueador de canales de calcio (CCB)" incluye dihidropiridinas (DHPs) y no DHPs (ej., CCBs tipo diltiazem y tipo verapamil). Ejemplos incluyen amlodipina, Bepridil, Diltiazem, felodipina, riosidina, isradipina, lacidipina, nicardipina, nifedipina,

niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, Verapamil y nivaldipina, y preferiblemente es un no-DHP representativo seleccionado a partir del grupo que consta de flunarizina, prenilamina, diltiazem, fendilina, galopamil, mibefradil, anipamil, tiapamil y verapamil, o, sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

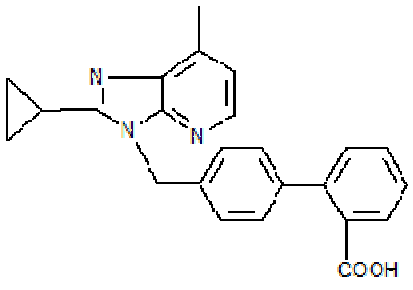
Los CCBs pueden utilizarse como fármacos anti-angina hipertensivos, anti-angina de pecho, o fármacos anti-arrítmicos.

El término "diurético" incluye derivados tiazídicos (por ejemplo, clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida y clorotalidon).

El término “Mimético de ApoA-I” inclye péptidos D4F (*ej.*, fórmula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F) (SEQ ID NO: 18).

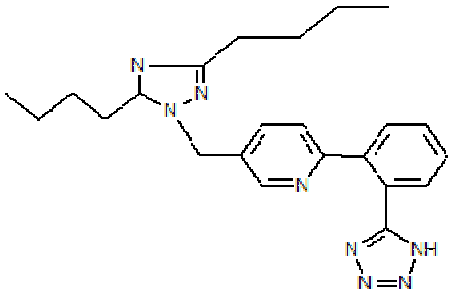
Un antagonista del receptor de antiotensina II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se entiende es un ingrediente activo que se fija al subtipo del receptor AT1 del receptor de angiotensina II pero no resulta en activación del receptor. Como una consecuencia de la inhibición del receptor AT_1, estos antagonistas pueden, por ejemplo ser empleados como antihipertensivos o para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva.

La clase de antagonistas de receptores AT_1 comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales, esencialmente se prefieren aquellos no peptídicos. Por ejemplo, se pueden mencionar los compuestos que son seleccionados a partir del grupo que consta de valsartan, losartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, saprisartan, tasosartan, telmisartan, el compuesto con la designación E-1477 de la siguiente fórmula

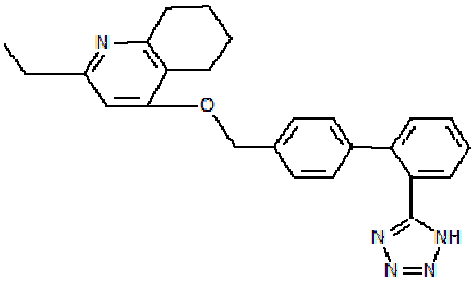


,

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



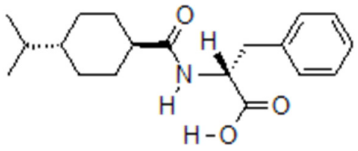
y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula



o, en cada caso, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los antagonistas preferidos de receptores AT_1 son candesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan, valsartan. También se prefieren aquellos agentes que se han comercializado, el más preferido es valsartan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "agente anti-diabético" incluye mejoradores de secreción de insulina que promueven la secreción de insulina desde células β pancreáticas. Ejemplos incluyen derivados de biguanida (*ej.*, metformina), sulfonilureas (SU) (*ej.*, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-chloro-*N*-[(1-pirolidinilamino)carbonil]-bencensulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepid, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida, y tolilciclamida), o sales farmacéuticamente acetables de los mismos. Ejemplos adicionales incluyen derivados de fenilalanina (*ej.*, nateglinida [*N*-(*trans*-4-isopropilciclohexilcarbonil)-*D*-fenilalanina] (cf. 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-oxoetil}benzoico] (cf. EP 589874, EP 147850 A2, en particular Ejemplo 11 en pagina 61, y EP 207331 A1); dihidrato propionato (2*S*)-2-bencil-3-(*cis*-hexahidro-2-isoindolilcarbonil)- de calcio (*ej.*, mitiglinida (cf. EP 507534)); y glimepirida (cf. EP 31058).

Ejemplos adicionales de segundos agentes con los que el péptido y polipéptido de la invención pueden utilizarse en combinación incluyen inhibidores de DPP-IV, GLP-1 y agonistas de GLP-1.

DPP-IV es responsable de inactivar GLP-1. Más particularmente, DPP-IV genera un antagonista del receptor GLP-1 y por lo tanto acorta la respuesta fisiológica a GLP-1. GLP-1 es un estimulador principal de secreción de insulina pancreatica y tiene efectos benéficos directos en la eliminación de la glucosa.

El inhibidor de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) puede ser peptídico o, preferiblemente, no-peptídico. Los inhibidores de DPP-IV son en cada caso genericamente y específicamente divulgados *ej.,* en WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, 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 trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan en la presente solicitud como referencia a estas publicaciones. Se prefieren aquellos compuestos que se divulgan específicamente en el Ejemplo 3 de WO 98/19998 y Ejemplo 1 de WO 00/34241, respectivamente.

GLP-1 (péptido 1 tipo glucagón) es una proteína insulinotropica la cual es descrita, *ej.*, por W.E. Schmidt et al. en *Diabetologia*, 28, 1985, 704-707 y en US 5,705,483.

El término “agonistas de GLP-1” incluye variantes y análogos de GLP-1(7-36)NH_2 los cuales se divulgan en particular en US 5,120,712, US 5,118666, US 5,512,549, WO 91/11457 y por C. Orskov en J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826. Ejemplos adicionales incluyen GLP-1(7-37), en los cuales el compuesto, la funcionalidad de amida carboxi-terminal de Arg^{36} se desplaza con Gly en la posición 37 de la molécula GLP-1(7-36)NH_2 y variantes y análgos de las mismas incluyendo GLN^9-GLP-1(7-37), D-GLN^9-GLP-1(7-37), acetil 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. Se otorga preferencia especial al análogo del agonista de GLP exendina-4, descrito por Greig en Diabetologia 1999, 42, 45-50.

También incluidos en la definición "agente anti-diabético" están los potenciadores de sensibilidad a la insulina los cuales restauran la función deteriorada del receptor de insulina para reducir la resistencia a la insulina y consecuentemente aumentan la sensibilidad a la insulina. Ejemplos incluyen derivados de la tiazolidinodiona hipoglicémica (*ej.*, glitazona, (*S*)-((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2*H*-1-benzopiran-6-il)metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-{[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxopropil)-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-naftilsulfonil)-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-hidroxietoxi]bencil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-[4-(1-fenil-1-ciclopropanocarbonilamino)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-dihidroindol-1-il)etoxi)fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-cloro-fenil])-2-propinil]-5-fenilsulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-clorofenil])-2-propinil]-5-(4-fluorofenil-sulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-{[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)fenil]metil}-tazolidina-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-2*H*-1-benzopiran-2-il)metoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-[6-(2-fluoro-benciloxi)naftalen-2-ilmetil]-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-{[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil}tiazolidina-2,4-diona (T-174) y 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-(4-trifluorometil-bencil)benzamida (KRP297)).

Agentes anti-diabéticos adicionales incluyen, moduladores de la vía de señalización de insulina, inhibidores similares de las proteina tirosina fosfatasas (PTPases), compuestos miméticos antidiabéticos de moléculas no pequeñas e inhibidores de la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT); compuestos que influyen en la produccíón de glucosa hepática no regulada, inhibidores similares de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-Bpasa), inhibidores de la glicogen fosforilasa (GP), antagonistas del receptor de glucagón e inhibidores de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

(PEPCK); inhibidores de la piruvato deshidrogenasa (PDHK); inhibidores del vaciado gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de proteínas no acopladoras (UCPs); agonistas PPAR tipo no-glitazona; agonistas duales PPARα/ PPARγ; compuestos que contienen vanadio antidiabético; hormones de incretina, péptido 1 tipo glucagón (GLP-1) y agonistas de GLP-1; antagonistas de receptores de imidazolina de células beta; miglitol; antagonistas α_2-adrenérgicos; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados a partir de bloqueadores de receptores β-adrenérgicos tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas del receptor de angiotensina II tales como bloqueadores AT1; agentes antidiabéticos tales como inhibidores DPPIV (ej. vildagliptina) y agonista del péptido GLP1.

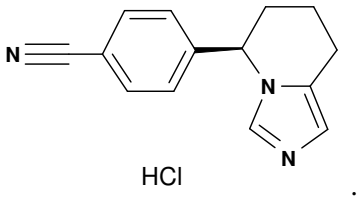
El término “agente reductor de la obesidad” incluye inhibidores de la lipasa (ej., orlistat) y supresores del apetito (ej., sibutramina y fentermina).

Un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se entiende que es un ingrediente activo que tiene la propiedad de inhibir la producción de aldosterona. La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una ezima mitrocondrial del citocromo P450 que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, es decir la conversión de 11-desoxicorticosterona en aldosterona**.** La inhibición de la producción de aldosterona con los conocidos inhibidores de la aldosterona sintasa se conoce como una variante exitosa al tratamiento de hipocalemia, hipertensión, insuficiencia cardiaca congestiva, fibrilación auricular o insuficiencia renal. Tal actividad de inhibición de la aldosterona sintasa se determina facílmente por los expertos en la técnica según ensayos estándar (*ej.*, EE.UU. 2007/0049616).

La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende inhibidores de la aldosterona sintasa tanto ésteroideos como no ésteroideos, los últimos siendo los más preferidos.

Se otorga preferencia a inhibidores de la aldosterona sintasa comercialmente disponibles o a aquellos inhibidores de la aldosterona sintasa que han sido aprobados por las autoridades de la salud.

La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende compuestos que tiene diferentes características estructurales. Un ejemplo de inhibidor no ésteroideo de la aldosterona sintasa es el enantiomero (+) del hidrocloruro de fadrozol (patentes EE.UU. 4617307 y 4889861) de la fórmula



.

O, si es apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos genericamente y específicamente divulgados ej., en US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incorporan en la presente solicitud como referencia a esta publicación. Inhibidores de la aldosterona sintasa preferidos adecuados para el uso en la presente invención incluyen, si limitación 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-metilbenzonitrilo; (4-metoxibencil)metilamida del ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxilico; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo; éster butilo del ácido 5-(4-Ciano-2-metoxifenil)-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-metoxibenzonitrilo; áster 4-fluorobencilo del ácido 5-(2-Cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; éster metilo del ácido 5-(4-Ciano-2-trifluorometoxifenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-c]imidazol-5-carboxílico; éster 2-isopropoxietilo del ácido 5-(4-Ciano-2-metoxifenil)-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-metilbenzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo; 4-(6,7-Dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-2-metoxibenzonitrilo; 3-Fluoro-4-(7-metileno-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 enatiómero (R) o (S) de los mismos; o si apropiadamente, una sal farmaceuticamente aceptable de los mismos.

El término inhibidores de la aldosterona sintasa también incluye compuestos y análogos divulgados en WO2008/076860, WO2008/076336, WO2008/076862, WO2008/027284, WO2004/046145, WO2004/014914, WO2001/076574.

Además inhibidores de la aldosterona sintasa también incluyen compuestos y análogos descritos en las solicitudes de patentes EE.UU. US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 y en las solicitudes PCT WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 y en la solicitud de patente europea EP 1886695. Inhibidores de la aldosterona sintasa preferidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación 8-(4-Fluorofenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c1[1 ,41oxazina; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2-fluorobenzonitrilo; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2,6-difluorobenzonitrilo; 4-(5,6-Dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazin-8-il)-2-metoxibenzonitrilo; 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-Cianofenil)-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)naftaleno-1-carbonitrilo; 8-[4-(1*H*-Tetrazol-5-il)fenil1-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-c][1 ,4]oxazina como se desarrollan por Speedel o en cada caso, el enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si apropiable, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos genérica y específicamente divulgados en, por ejemplo, el documento WO 2009/156462 y WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones del compuesto y los productos finales de los ejemplos de trabajo, la materia objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones. Inhibidores preferidos de la aldosterona sintasa adecuados para la combinación en la presente invención incluyen, clorhidrato de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol-1-ilmetil)-benzonitrilo, 1-(4-Metanosulfonil-bencil)-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol, 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1H-indol, éster

etílico 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-ilmetil]-etanosulfonamida, éster 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilo del ácido pirrolidina-1-sulfonico, *N*-Metil-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(2-pirrolidin-1-il-etilamino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-3-il]-1-metil-1H-indol-3-carbonitrilo, 6-Cloro-1-metil-2-{5-[(1-metil-piperidin-4-ilamino)-metil]-piridin-3-il}-1H-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida del ácido Morfolina-4-carboxilico, *N*-[5-(6-Cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-etanosulfonamida, *C,C*,*C*-Trifluoro-N-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, N-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluorometil-bencenosulfonamida, N-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metanosulfonamida, N-(5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)butano-1-sulfonamida, N-(1-(5-(4-ciano-3-metoxifenil)piridin-3-il)etil)etanosulfonamida, N-((5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)(ciclopropil)metil)etanosulfonamida, N-(ciclopropil(5-(1*H*-indol-5-il)piridin-3-il)metil)etanosulfonamida, N-(ciclopropil(5-naftalen-1-il-piridin-3-il)metil)etanosulfonamida, [5-(6-cloro-1-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida del ácido etanosulfonico y {[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil}-etil-amida del ácido etanosulfonico.

El término “bloqueador del receptor de entotelina” 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 éster de colésterilo de varios ésteres de colésterilo y triglicéridos a partir de HDL a LDL y VLDL. Tal actividad de inhibición de CEPT se determina facílmente por los expertos en la técnica según ensayos estándar (*ej.*, Patente EE.UU. 6.140.343). Ejemplos incluyen compuestos divulgados en la Pat. EE.UU. No. 6,140,343 y Patente EE.UU.No. 6,197,786 (*ej.*, éster etilo del ácido [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluorometil-bencil)-metoxicarbonil-amino]-2-etil-6-trifluorometil-3,4-dihidro-2H-quinolin-1-carboxílico (torcetrapib); compuestos divulgados en la Patente EE.UU. No. 6,723,752 (*ej.*, (2R)-3-{[3-(4-cloro-3-etil-fenoxi)-fenil]-[[3-(1,1,2,2- tetrafluoro-etoxi)-fenil]-metil]-amino}-1,1,1-trifluoro-2-propanol); compuestos divulgados en la solicitud de patente EE.UU. Ser. No. 10/807,838; derivados de polipéptidos divulgados en la Patente EE.UU. No. 5,512,548; derivados de rosenonolactona y análogos que contienen fosfato de colésteril éster divulgado en *J. Antibiot.,* 49(8): 815- 816 (1996), y *Bioorg. Med. Chem. Lett.;* 6:1951-1954 (1996),

respectivamente. Además, los inhibidores de CETP también incluyen aquellos divulgados en WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, 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 neutral (NEP) EC 3.4.24.11. Ejemplos incluyen Candoxatril, Candoxatrilat, Dexecadotril, Ecadotril, Racecadotril, Sampatrilat, Fasidotril, Omapatrilat, Gemopatrilat, Daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 y éster etilo del ácido (2R,4S)-5-Bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionilamino)-2-metil-pentanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Inhibidores de NEP también incluyen derivados de dipéptido fosfono/biarilo sustituidos, como los divulgados en el Número de Patente EE.UU. 5,155,100. Los inhibidores NEP también incluyen el derivado de N-mercaptoacil-fenilalanina como se divulgó en la solicitud PCT Número WO 2003/104200.

Los inhibidores de NEP también incluyen agentes anti-hipertensivos de acción dual como se divulga en las solucitudes PCT No. WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen compuestos divulgados en solicitud EE.UU. No. 12/788,794; 12/788,766 y 12/947,029. Los inhibidores de NEP también incluyen los compuestos divulgados en WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 y solicitudes EE.UU. provisionales No 61/414171 y 61/414163.

En una realización, la invención proporciona un método de activar el receptor APJ, en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

En una realización, la invención proporciona un método de tratar un trastorno o una enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo o un bioconjugado del mismo.

En una realización, la invención proporciona un método de tratar un trastorno o una enfermedad sensible a la activación (agonismo) del receptor APJ, en un sujeto, en donde el trastorno o la enfermedad se selecciona a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis,

enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

En una realización, la invención proporciona un compuesto según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o un biocojugado del mismo, para uso como un medicamento.

En una realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV, o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ. En otra realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido según la definición de cualquiera de las fórmulas I a IV o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en donde dicho trastorno o enfermedad se selecciona en particular a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatia, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrofica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

Ejemplificación de la invención: Síntesis de péptidos y polipéptidoS

Abreviatura	**Definición**
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	ácido acético
Ac_2O	anhídrido acético
ε-Ahx	Ácido ε-Amino hexanoico
AM	Aminometil
BAL	Enlazador de amida de esqueleto
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Boc	*tert*-Butiloxicarbonil
Bzl	Bencilo
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N, *N*'-diisopropiletilamina
DMA	*N,N*'-Dimetilacetamida
DMF	*N,N'*-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DVB	Divinilbenceno
EDT	Etanoditiol
FA	Ácido Fórmico
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBSS	Solución salina amortiguada de Hank
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetilanosulfónico

HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HSA	Albúmina sérica humana
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
HRMS	Espectrometría de masa de alta resolución
ivDde	(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
LN	Logarithmus naturali (logaritmo natural)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masa
Nal	2-Naftilalanina
Nle	Norleucina
NMP	N-Metilpirrolidina
Oxima Pura	2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil
*p*E	Piroglutamato
PG	Grupo protector
PBS	Solución salina amortiguada por fosfato
Ph	Fenil
PhP	Fenilprolina
Pip	Ácido pipecólico
Pol	Soporte polimérico
PS	Poliestireno
rt	temperatura ambiente
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SPPS	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida
TBME	terc-butilmetiléter
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
tBuOH	*terc*-butanol
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

TIS, TIPS	triisopropilsilano
t_R	tiempo de retención
Trt	Tritilo
UPLC:	Cromatografía líquida de ultra desempeño
UV	Ultravioleta

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

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

- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 μm, 30x100 mm, Part No. 186002572 (una columna o dos columnas en serie)
- Columna Waters Atlantis Prep OBD T3, 5 μm, 30x150 mm, Parte No.186003703
- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 μm, 30x50 mm, Part No. 186002572

Las fases moviles constaron de eluyente A (0.1% TFA en H_2O) y eluyente B (ACN). Los gradientes se diseñaron con base en los requerimientos específicos del problema de 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 nm y UPLC-MS usando ionización por electroatomización.

Los péptidos mostrados en la Tabla 4 se sintetizaron utilizando los procedimientos generales descritos a continuación Los extremos N o C no sustituidos se indican por *H* o *OH* itálicas, respectivamente.

Tabla 4

Ejemplo	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
Ejemplo 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	19
Ejemplo 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*	20
Ejemplo 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*	21
Ejemplo 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2	22
Ejemplo 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*	23
Ejemplo 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	24
Ejemplo 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	25
Ejemplo 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*	26
Ejemplo 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)*	27
Ejemplo 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*	28
Ejemplo 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*	29
Ejemplo 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	30
Ejemplo 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	31
Ejemplo 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	32
Ejemplo 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	33
Ejemplo 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	34
Ejemplo 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	35
Ejemplo 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*	36
Ejemplo 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	37
Ejemplo 20	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	38
Ejemplo 21	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	39
Ejemplo 22	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	40
Ejemplo 23	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	41
Ejemplo 24	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	42
Ejemplo 25	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH_2*	43

Ejemplo 26	*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*	44
Ejemplo 27	*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*	45
Ejemplo 28	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*	46
Ejemplo 29	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*	47
Ejemplo 30	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*	48
Ejemplo 31	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*	49
Ejemplo 32	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetilo)*	50
Ejemplo 33	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	51
Ejemplo 34	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*	52
Ejemplo 35	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*	53
Ejemplo 35	*H*-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*	54
Ejemplo 36	*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*	55
Ejemplo 37	*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*	56
Ejemplo 38	*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*	57

en el que los dos aminoácidos marcados con "*" representan los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o amida a través de su cadena lateral.

Métodos Analíticos

1a) HPLC-Método Analítico A

- Columna: Waters Xbridge™ C18 (50x4.0 mm), 3.5 µm; Parte n°: 186003031
- Eluyente A: TFA al 0,07% en agua / Eluyente B: TFA al 0,1% en ACN
- Flujo: 1,5 ml/min
- Temperatura: 40 ° C
- Gradiente:

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

12,2	95	5

1b) HPLC-Método Analítico A

- Columna: Xbridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 µm; Parte n°: 186003612
- Eluyente A: TFA al 0,1% en agua / Eluyente B: TFA al 0,1% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 40 ° C
- Gradiente:

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

2a) UPLC-MS-Método Analítico C

- Columna: Acquity UPLC® BEH300 C18 (50x2.1 mm), 1,7 µm; Parte n°: 186003685
- Eluyente A: TFA al 0,05% en agua / Eluyente B: TFA al 0,04% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 80 ° C
- Gradiente:

Tiempo [min]:	A [%]	B [%]
0,0	100	0
0,2	100	0
4,4	2	98
4,8	2	98
4,9	100	0
5,0	100	0

2b) UPLC-HRMS-Método Analítico D

- Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7.um, 2.1x50mm, Parte n°: 186002350
- Eluyente A: FA al 0,05% + acetato de amonio 3,75 mM en agua, Eluyente B: FA al 0,04% en ACN
- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 ° C
- Gradiente: 2 a 98% en 4.4 min

3) Método Analítico E:

- Columna Xbridge C18, 3.5 µm, 3.0 x 30 mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: CAN
- Tasa de flujo: 2 mL/min
- Gradiente: 0 min 40% B; 40% a 95% B en 1.70 min, 2.0 min 95% B; 2.1 min 40% B
- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 150-1600
- HPLC: Agilent serie 1100
- Temperatura: 40C

3) Método Analítico F:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%)
- Tasa de flujo: 1 mL/min
- Gradiente: 0 min 2% B; 2% a 98% B en 1.7 min, 2.06min 98% B; 2.16min 2% B
- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperatura: 50C

3) Método Analítico G:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm
- Eluyente: A: Agua (Ácido Fórmico al 0.1%); B: ACN (ácido fórmico al 0,1%)
- Tasa de flujo: 1 mL/min
- Gradiente: 0 min 40% B; 40% a 98% B en 1.40 min, 2.05 min 98% B; 2.1 min 40% B

- Espectrómetro de masas: Single Quadrupole ESI rango de barrido 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperatura: 50C

Los datos analíticos para péptidos de los Ejemplos 1 a 38 se resemen en la Tabla 5 y se generó utilizando los métodos analíticos descritos anteriormente.

Tabla 5

	HPLC		**Espectrometría de masa**				
Péptido	**t_R [min]**	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (medido)	**$[M+3H]^{3+}$** (medido)	**Método**	**$[M+2H]^{2+}$** (calculado)	**$[M+3H]^{3+}$** (calculado)
Ejemplo 1	3,48	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 2	3,66	A	735,4	490,6	C	735,4	490,6
Ejemplo 3	3,60	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 4	2,65	A	683,4	455,9	C	683,4	455,9
Ejemplo 5	3,95	A	782,4	521,9	C	782,4	521,9
Ejemplo 6	3,49	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 7	3,55	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 8	2,85	A	719,3	479,9	C	719,4	479,9
Ejemplo 9	3,75	A	742,4	495,3	C	742,4	495,3
Ejemplo	3,55	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3

10							
Ejemplo 11	3,57	A	686,9	458,3	C	686,9	458,2
Ejemplo 12	3,51	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 13	3,54	A	764,4	509,9	C	764,4	509,9
Ejemplo 14	3,46	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 15	3,44	A	757,4	505,3	C	757,4	505,3
Ejemplo 16	3,59	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 17	3,61	A	771,4	514,6	C	771,4	514,6
Ejemplo 18	7,60	B	775,391	517,263	D	775,385	517,256
Ejemplo 19	7,40	B	751,392	501,263	D	751,385	501,256
Ejemplo 20	3,41	A	743,4	495,9	C	743,4	495,9
Ejemplo 21	7,35	B	730,355	487,239	D	730,361	487,241
Ejemplo 22	8,62	B	739,877	493,587	D	739,856	493,573
Ejemplo 23	7,32	B	737,374	491,918	D	737,377	491,921
Ejemplo 24	7,35	B	737,375	491,919	D	737,377	491,921
Ejemplo 25	5,63	B	620,822	414,217	D	620,825	414,219

Ejemplo 26	7,58	B	754,368	503,247	D	754,361	503,241
Ejemplo 27	7,36	B	737,374	491,918	D	737,369	491,913
Ejemplo 28	3,63	A	713,9	476,2	C	713,8	476,2
Ejemplo 29	3,78	A	720,9	480,9	C	720,9	480,9
Ejemplo 30	3,82	A	691,9	461,6	C	691,8	461,6
Ejemplo 31	3,74	A	643,3	429,2	C	643,3	429,2
Ejemplo 32	8,01	B	643,328	429,222	D	643,324	429,252
Ejemplo 33	7,73	B	700,832	467,557	D	700,845	467,566
Ejemplo 34	7,17	B	609,809	406,875	D	609,810	406,876
Ejemplo 35	8,99	B	710,351		D	710,332	473,890
Ejemplo 35	6,89	B	568,289	379,196	D	568,292	379,197
Ejemplo 36	7,69	B	724,843	483,564	D	724,837	483,558
Ejemplo 37	6,62	B	715,848	477,568	D	715,843	477,562
Ejemplo 38	8,28	B	728,873		D	728,869	

Procedimientos Sintéticos Generales

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (1 eq., 1,0-1,6 mmol / g) se lavó a fondo con DCM. El aminoácido deseado (típicamente 0,5-2 eq. relativo a la resina, considerando una carga de 1,6 mmol / g) se disolvió en DCM (aprox. 10 mL por gramo de resina) y DIPEA (4 eq. relativa a la resina, considerando una carga de 1,6 mmol / g). La solución se agregó a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3-16 h. La resina se drenó y luego se lavó a fondo secuencialmente con DCM / MeOH / DIPEA (17:02:01), DCM, DMA, DCM.

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

La carga de la resina se calcula según la fórmula:

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

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

2) Síntesis de péptidos en fase sólida

2a) Síntesis de Ciclo A en sintetizador Prelude$_{TM}$

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina / DMA (1:4) o 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), y DIPEA (4,5 eq.; solución a 0,9 M en NMP) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA la etapa de acoplamiento se repite típicamente 1 a 3 veces dependiendo de los requisitos específicos.

Después del lavado con DMA, se llevó a cabo el recubrimiento mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2a) Ciclo de Síntesis B en sintetizador Prelude™

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (3 eq.; solución a 0,2 M en NMP), HCTU (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), y DIPEA (3,3 eq.; solución a 0,66 M en NMP) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 min a 4 h, dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMA la etapa de acoplamiento se repite típicamente 1 a 3 veces dependiendo de los requisitos específicos. Después de lavar con DMAm, se realizó capping mediante la adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y la posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2b) Ciclo de Síntesis C en sintetizador Prelude™

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina / DMA (1:4) o 4-metilpiperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA. Se realizó capping mediante adición de una mezcla de Ac_2O/piridina/DMA (1:1:8) y posterior mezcla de la suspensión a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMA.

2c) Ciclo de Síntesis D en sintetizador Liberty™

La resina se lavó con DMF y DMC. Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina / DMF al 20% (típicamente 7 ml por 0,1 mmol dos veces). La resina se lavó con DMF y DMC. El acoplamiento se realiza mediante la adición del aminoácido Fmoc (5 eq.; solución a 0,2 M en NMP), HCTU (5 eq.; solución a 0,5 M en DMF), y DIPEA (10 eq.; solución a 2 M en DMF) seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a 75 o 50 ° C durante típicamente 5 a 50 min con potencia microondas de 0 a 20 watts dependiendo de los

requisitos específicos. Después de lavar con DMF la etapa de acoplamiento se puede repetir una vez dependiendo de los requisitos específicos. La resina se lavó con DMF.

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

3a) Método de Escisión A

La resina (0,1 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h con TFA/EDT/TIS acuoso al 95% (95:2.5:2.5) (3 mL). La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió una solución fresca (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (10-20 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Este paso se realiza 1-2 veces. El sólido se secó en alto vacío.

3b) Método de Escisión B

La resina (0,1 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h con TFA/TIS/DTT acuoso al 95% (95:2.5:2.5) (3 mL). La solución de escisión se separó por filtración. La resina se lavó una vez con TFA acuoso al 95% (1 ml). Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (10 ml) al resid uo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se vertió, el proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó en alto vacío.

3c) Método de Escisión C

Se añadió HFIP / DCM (1:3) (3 ml) a la resina (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La solución de escisión se separó por filtración y se

recogió. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la resina se lavó una vez con HFIP / DCM (1:3) (1 ml). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. El producto crudo se liofilizaron a partir de ACN/H_2O.

4) Formación de disulfuro

4a) Método de Ciclización A

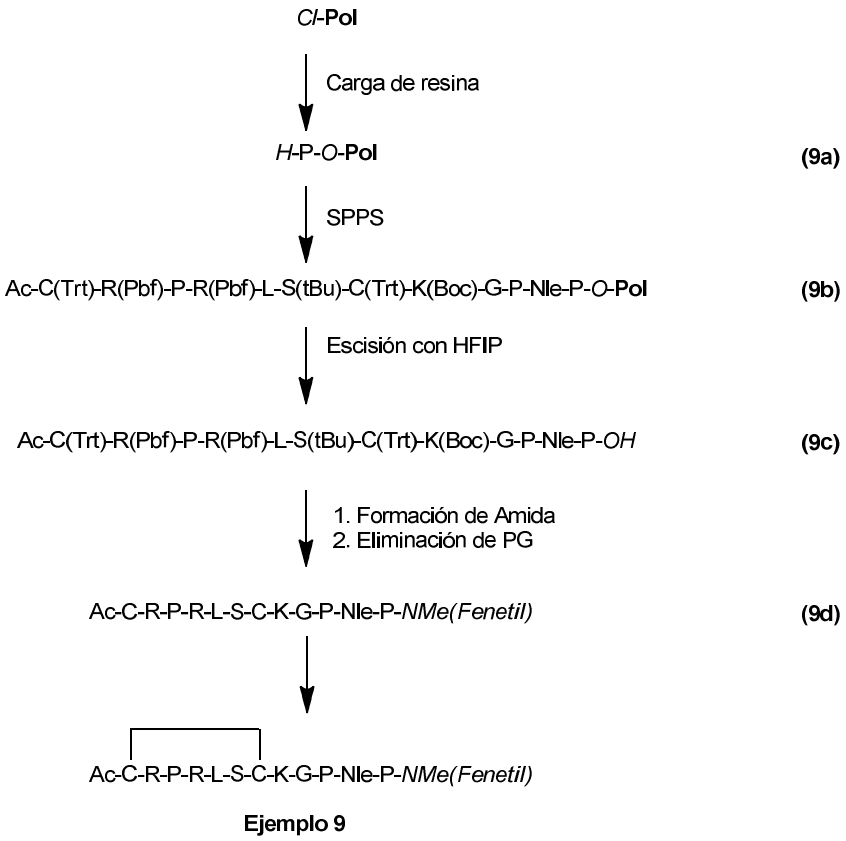
El péptido precursor lineal completamente desprotegido se disolvió en H_2O/DMSO (9:1) o (4:1) para proporcionar típicamente una concentración de 0,5-7 mM. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16-96 h típicamente, dependiendo de los requisitos y después se concentró a sequedad a alto vacío.

4b) Método de Ciclización B

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente) se disolvió en H_2O para proporcionar típicamente una concentración de 1-25 mM. Se añadió una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (1-2 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se logra la conversión completa. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O para apagar el exceso de I_2.

En el siguiente se describen las síntesis de ejemplos representativos.

Ejemplo 9 Síntesis de Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 27)



Ejemplo 9

(SEQ ID NOS 58, 58, 27 y 27 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 9ª**

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (2,00 g, 3,20 mmol) se lavó con DCM (3x). Se añadió una solución de Fmoc-P-OH (1,08 g, 3,20 mmoles) en DCM (20 ml) y DIPEA (2,24 ml, 12,8 mmol) y la suspensión se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. La resina se lavó a fondo con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x).

A continuación, la resina se trató doce veces durante 2 min con una mezcla de piperidina / DMA (1:4) (12 ml cada vez). Las soluciones de piperidina / DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina (véase procedimiento general).

La resina se lavó a fondo con DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) y se secó a vacío para proporcionar el **Intermediario 9a** (2,25 g, carga = 1,12 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 9b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermediario 9a (89 mg, 0,10 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

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

- Preparación de **Intermediario 9c**

(Escisión de HFIP a partir de la resina)

Se añadió HFIP / DCM (1:3) (3 ml) al **Intermediario 9b** (0,100 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La solución de escisión se separó por filtración y se recogió. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, la resina se lavó una vez con HFIP / DCM (1:3) (1 ml). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron

a sequedad al vacío. El producto crudo se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Intermediario 9c** (37,2 mg, 14,8 µmol) como un sólido blanco.

- Preparación de **Intermediario 9d**

(Formación de amida y eliminación del grupo protector)

Se disolvieron **Intermediario 9c** (37,0 mg, = 14,7 µmoles) y TBTU (7,1 mg, 22,1 µmol) en DCM (5 ml). DIPEA (5,1 µl, 29,4 µmol) se añadió y la solución se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. Se agregó N-metil-fenetilamina (3,2 µl, 22.1 µmol), la reacción se agitó durante 1 h 40 min a temperatura ambiente y después se repartió entre EtOAc / n-butanol (9:1) (50 ml) y NaHCO3 acuoso al 5%(5 ml). La capa orgánica se lavó con $NaHCO_3$ acuoso al 5% (5 ml), salmuera (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró a sequedad a vacío.

El residuo se disolvió en metanol en TFA / TIS / EDT (95:2,5:2,5) (5 ml) acuoso al 95%. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente y después se vertió en heptano / éter frío (1:1) (35 ml). La suspensión se centrifugó y el solvente se decantó. El residuo se lavó dos veces con éter dietílico / heptano frío (1:1) (10 ml) y después se secó a vacío para proporcionar **Intermediario 9d** (27,0 mg, 14,7 µmoles) como un sólido de color beige. El producto se sometió al siguiente paso sin purificación.

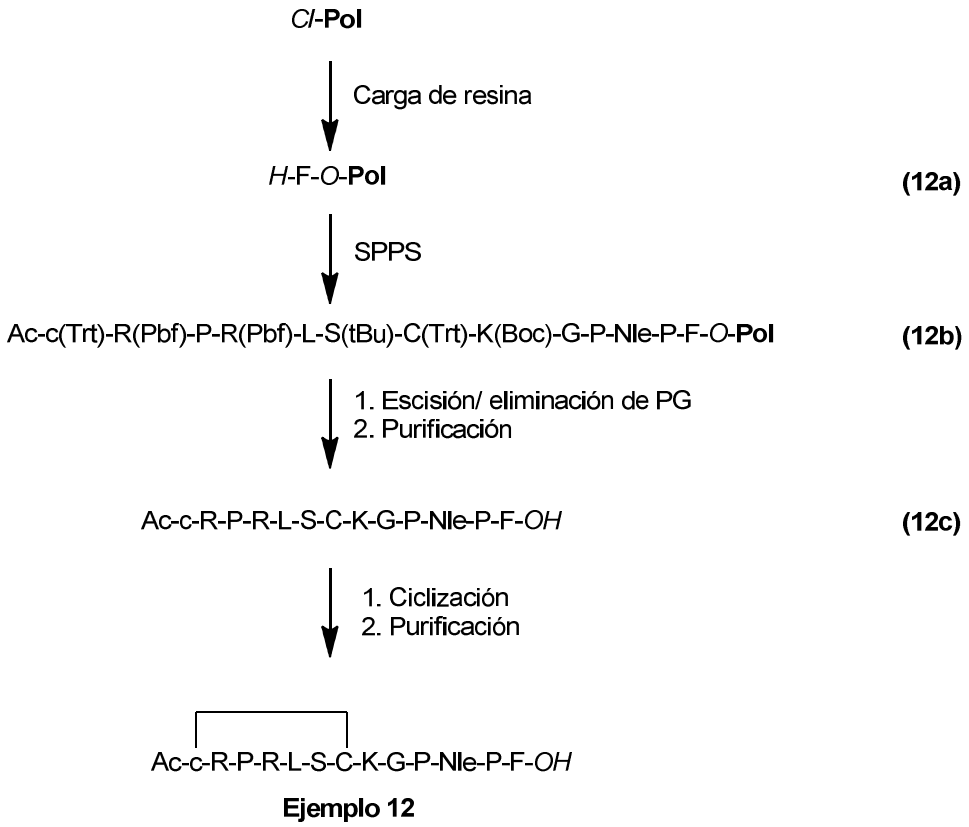
- Preparación del **Ejemplo 9**

(Formación de disulfuro y purificación)

Se disolvió **Intermediario 9d** (26,9 mg, 14,7 µmol) en H_2O (3,7 ml) (la solución era ligeramente turbia). Una solución de I_2 50 mM en AcOH (0,353 ml, 17,6µmol) se añadió y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O (0.044 ml, 22,1µmol) para apagar el exceso de yodo. La solución se concentró a aproximadamente 3,5 ml y después se sometió a HPLC preparativa de fase inversa. Las fracciones se liofilizaron para proporcionar el **Ejemplo 9** (6,8 mg, 3,7 µmoles) como un sólido blanco.

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A; t_R = 3,75 min) y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$=495.3; calculado: $[M+3]^{3+}$=495.3).

Ejemplo 12 Síntesis de Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 30)



(SEQ ID NOS 59, 30 y 30 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 12ª**

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

Resina de cloruro de 2-clorotritilo (10,0 g, 16,0 mmol) se lavó con DCM (3x). Se añadió una solución de Fmoc-F-OH (12,4 g, 32,0 mmoles) en DCM (100 ml) y DIPEA (11,2 ml, 64,0 mmol) y la suspensión se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. La resina se lavó a fondo con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1) (3x), DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x).

A continuación, la resina se trató doce veces durante 2 min con una mezcla de piperidina / DMA (1:4) (50 cada vez) seguido por lavado con DMA (2x). Las soluciones de piperidina / DMA y soluciones de lavado de DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina (véase procedimiento general).

La resina se lavó a fondo con DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) y se secó a vacío para proporcionar el **Intermediario 12a** (12,8 g, carga = 0,79 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 12b**

  (Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermediario 12a (127 mg, 0,10 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos Prelude™. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Ciclo de Síntesis
1	P	2 x 1 h	A
2	Nle	2 x 1 h	A
3	P	2 x 1 h	A
4	G	2 x 2 h	A
5	K(Boc)	2 x 1 h	A
6	C(Trt)	1 x 3 h	A
7	S(tBu)	2 x 1 h	A
8	L	2 x 1 h	A
9	R(Pbf)	4 x 3 h	A
10	P	2 x 2 h	A
11	R(Pbf)	4 x 3 h	A
12	c(Trt)	1 x 3 h	A
13	Ac	1 x 20 min	C

- Preparación de **Intermediario 12c**

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

Intermediario 12b (0.10 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4x). Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron sobre una mezcla de heptano / dietil éter frío(1:1) (35 ml), proporcionando un precipitado. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se lavó de nuevo con heptano / dietil éter frío (1:1) (10 ml), la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó para proporcionar **el Intermediario 12c** (53 mg, 0,029 mmol).

- Preparación del **Ejemplo 12**

(Ciclización y purificación)

Intermediario 12c (53 mg, 0,029 mmoles) se disolvió en H_2O/DMSO (9:1) (18 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 hora luego se concentró hasta sequedad al vacío. El producto crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó para proporcionar el **Ejemplo 12** como un sólido blanco (27,4 mg, 0,014 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A; t_R = 3,51 min) y UPLC-MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}$=505.3; calculado: $[M+3]^{3+}$=505.3).

Ejemplo 18 Síntesis de Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH* (C^1-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 36)

Síntesis de péptidos lineales sobre un soporte sólido:

Resina Fmoc-D-Phe-Wang (sustitución: 0,66 mmol / g) se sometió a síntesis de péptidos de fase sólida manual a través de química Fmoc estándar. resina a 0,3 mmol se hinchó en DMF durante 30 minutos; DMF se drenó y la resina se trató con piperidina al 20% en DMF durante 30 min para eliminar el grupo Fmoc. La resina se lavó con DMF 3 veces y se acopla con una solución de aminoácidos Fmoc pre-activadas (aminoácido Fmoc / HBTU / HOBt / NMM = 3:3:3:6 eq) durante 2 horas. Prueba de ninhidrina se realizó después de cada acoplamiento para comprobar la eficacia de acoplamiento.

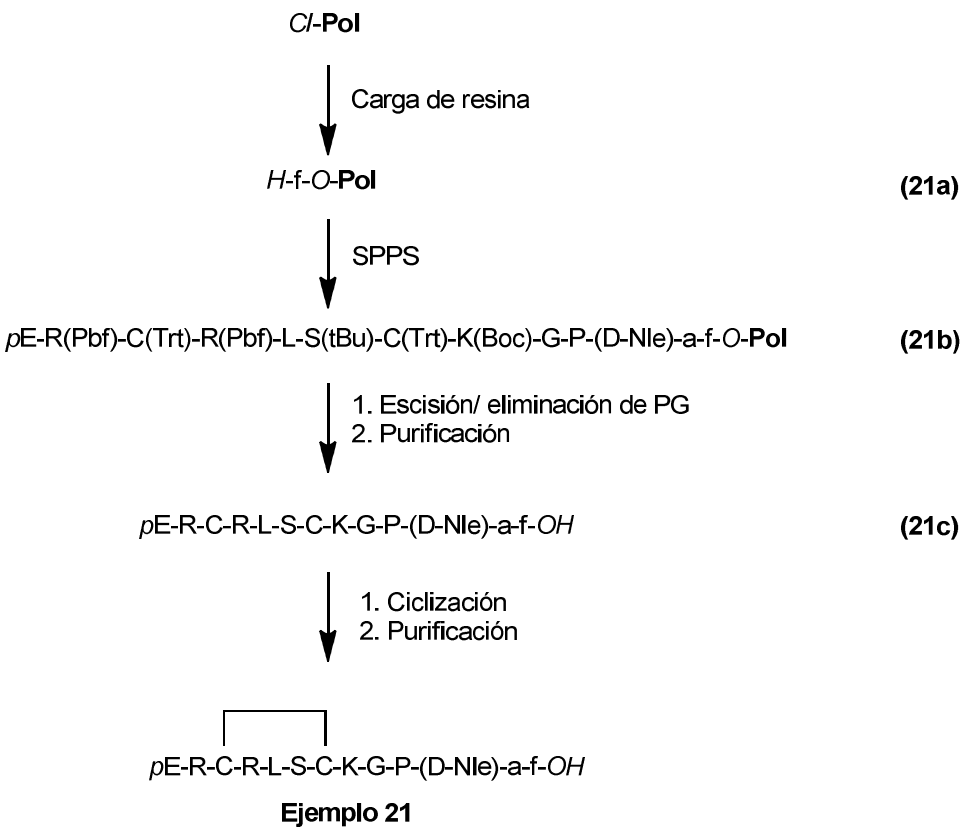
La cadena de péptido se ensambló a la resina mediante eliminación repetitiva del grupo protector Fmoc y acoplamiento del aminoácido protegido hasta extremo N-terminal. Después del acoplamiento del último aminoácido, resina peptídica se lavó con DMF y éter etílico, y se secó bajo vacío. La resina peptídica secada se trató con cóctel de escisión de TFA (TFA/tiolanisol/fenol/EDT/H_2O = 87.5:5:2.5:2.5:2.5, v / v) para la escisión y eliminación de los grupos protectores de cadena lateral. Los péptidos crudos se precipitaron en éter frío, se recogieron por filtración y se secaron a alto vacío. Los péptidos crudos se purificaron en HPLC (Columna: Delta Pak C18 de 2" pulgadas, Longitud de onda: 215 nm) para proporcionar el producto deseado.

Ciclización:

Cada uno de los péptidos crudos se disolvió en agua-acetonitrilo (reactivo A.C.S., Fisher) a una concentración de 1mg/ml (alrededor de 80%: 20%; Agua: Acetonitrilo, V:V), 0,1 M I_2 (reactivo A.C.S., Sigma Aldrich) en AcOH al 50% (reactivo A.C.S., Fisher) / H_2O se añadió por goteo a la solución con agitación vigorosa hasta que el color de I_2 persiste. Al terminar la oxidación (monitorizada por HPLC analítica y espectroscopia de masas), ácido L-ascórbico a 1 M (reactivo A.C.S., Sigma Aldrich) solución acuosa se añadió por goteo con agitación continua para reducir el exceso de I_2 hasta que la solución se vuelve incolora. Después de la filtración, la solución anterior se cargó sobre columna C18 de 2 pulgadas (detección a 215 nm), y se purificó mediante el uso de búfer de TFA (Búfer A, TFA al 0,1% (calidad A.C.S., NuGeneration Technology, LLC) en agua; Búfer B, acetonitrilo al 100%), fracciones recogidas con pureza de > 95% se liofilizaron para secar.

Example 21 Síntesis de *p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH* (C^3-C^7 disulfuro) (SEQ

ID NO: 39)



Ejemplo 21

(SEQ ID NOS 60, 39 y 39, respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 21ª**

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

Se hizo reaccionar resina de cloruro de 2-clorotritilo (5,0 g, 8,01 mmol) con una solución de Fmoc-f-OH (3,10 g, 8,01 mmoles) en DCM (50 mL) y DIPEA (5,59 mL, 32,0 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermediario 21a** (5,87 g, carga = 0,897 mmoles / g).

- Preparación de **Intermediario 21b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

Intermediario 21a (89 mg, 0,100 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia Microondas	Ciclo de Síntesis
1	a	1 x 7,5 min	50	20	D
2	D-Nle	1 x 7,5 min	50	20	D
3	P	1 x 7,5 min	50	20	D
4	G	1 x 7,5 min	50	20	D
5	K(Boc)	1 x 7,5 min	50	20	D
6	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
7	S	1 X 7.5 min	50	25	D
8	L	1 x 7,5 min	50	25	D
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
10	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7,5 min	50	25	
12	*p*E	1 x 7.5 min	50	25	D

- Preparación de **Intermediario 21c**

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

Una mezcla de TFA / EDT / TDT acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml) se añadió al **Intermediario 21b** (0,1 mmoles). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h,

después la solución de escisión se separó por filtración. La resina se trató luego de nuevo con TFA / EDT / TIS al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml), se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, y se filtró. Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre una mezcla de heptano / éter dietílico frío (1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (10 ml) al residuo, la suspensión se agitó en vórtex durante 3 minutos y se centrifugó, y el sobrenadante se vertió, el proceso de lavado se repitió dos veces. El sólido se secó en alto vacío El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Intermediario 21c** (55 mg, 0,030 mmol).

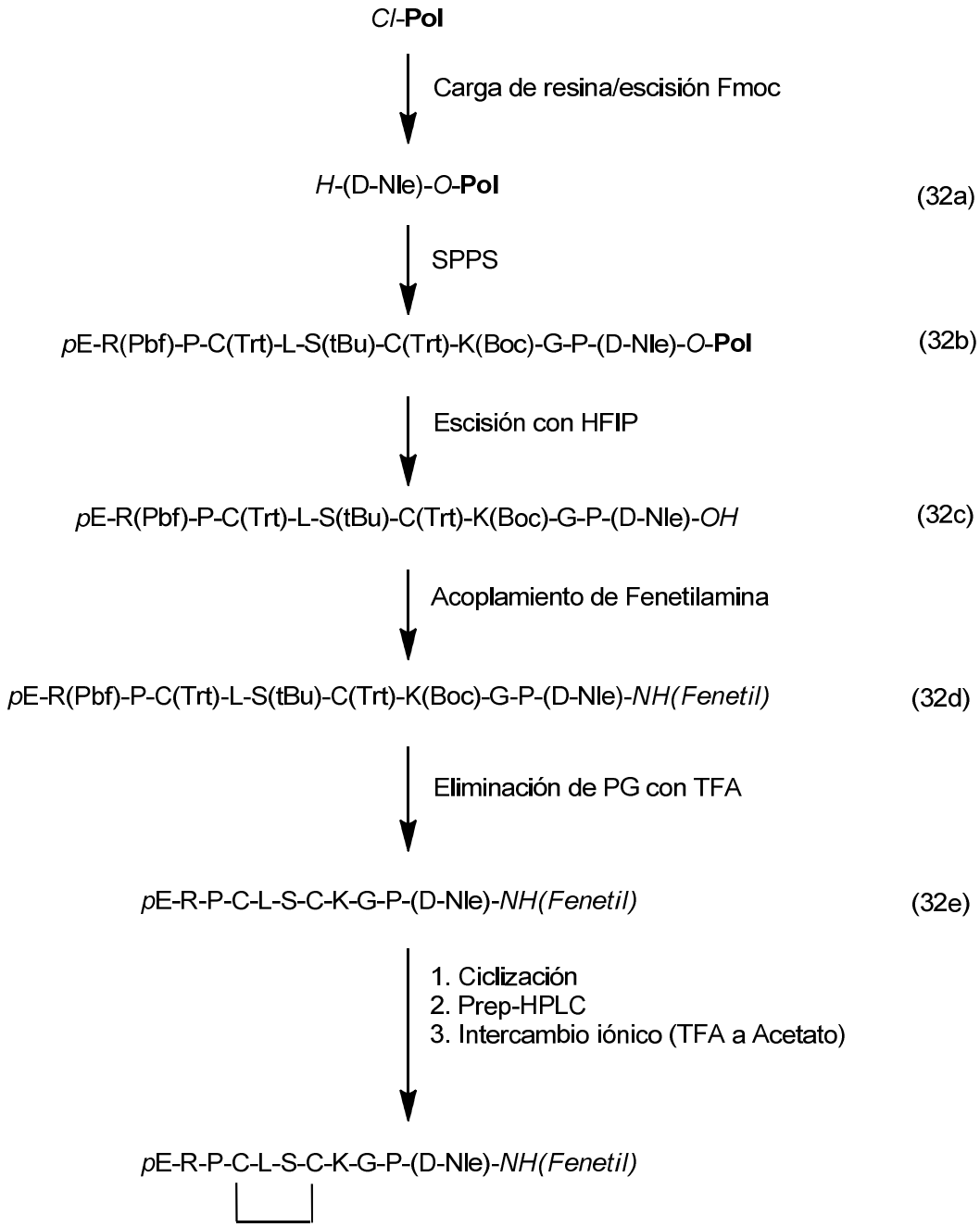
- Preparación de **Ejemplo 21**

  (Ciclización y Purificación)

Se disolvió **Intermediario 21c** (18 mg, 9,97 μmol) en H_2O (1,0 ml). Se añadió una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (0,24 ml, 12μmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente hasta que la LCMS mostró la terminación de la reacción. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O (24 μmol, 12 μmol) para apagar el exceso de I_2. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el Ejemplo 21 como un sólido blanco (12 mg, 6.32 μmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico B; t_R = 7,35 min) y UPLC-MS (Método analítico D; medido: $[M+2H]^{2+}$=730.355; calculado: $[M+2H]^{2+}$=730.361).

Example 32 Síntesis de Acetato de *p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetil)* (C^4-C^7 disulfuro) (SEQ ID NO: 50)



Ejemplo 32

(SEQ ID NOS 61, 61, 61, 50 y 50 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 32a**

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

Se suspendió resina de cloruro de 2-clorotritilo (50,0 g, 85,0 mmol) en DCM (400 ml), la suspensión se agitó durante 10 min y después el disolvente se drenó, la resina se lavó con DCM (3 x 200 ml). A continuación, una solución de Fmoc-D-Nle-OH (24,0 g, 68,0 mmol) y DIPEA (96,5 ml, 552,5 mmoles) en DCM (120,0 ml) se añadió a la resina, la suspensión se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió otra porción de DIPEA (22,7 ml, 127,5 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

La mezcla de reacción se drenó y la resina se lavó con DCM (3 x 250 ml) durante 2 minutos cada vez. La resina se inactivó con una mezcla de DCM / MeOH / DIPEA (70:15:15) (2 x 250 ml) durante 10 minutos cada vez.

El grupo Fmoc se escindió por tratamiento de la resina con piperidina / DMF (1:3) (1 x 300 ml) durante 5 min. la resina se drenó entonces (1 x 300 ml) durante 15 min, seguido por pasos de lavado: DMF (6 x 250 ml, 2 min cada vez), isopropanol (2 x 250 ml, 2 min cada vez) y TBME (6 x 250 ml, 2 min cada vez). La resina se secó bajo vacío a 35 ° C durante 24 horas para proporcionar **Intermediario 32a** (57,8 g, carga = 1,08 mmol / g).

- Preparación de **Intermediario 32b**

  (Ensamblaje de péptido lineal)

Intermediario 32a (18,5 g, 20,0 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptido automático (CSBIO536™). Un ciclo de acoplamiento se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (3,0 eq), DIC (3,0 eq), HOBt (3,0 eq), DMF (ver tabla abajo)
- Lavado: DMF (4 x 150 mL, 2 min cada vez).
- Desprotección Fmoc: Piperidina/DMF (1:3) (150 mL durante 5 min luego 150 mL durante 15 min).

- Lavado: DMF (6 x 150 mL, 2 min cada vez).

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt

Después de ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (6 x 250 ml, 2 min cada vez), isopropanol (6 x 150 ml, 2 min cada vez) y TBME (6 x 150 ml, 2 min cada vez). La resina peptídica se secó durante la noche bajo alto vacío a 35 ° C para proporcionar el **Intermediario 32b** (57,6 g, 20,0 mmol).

- Preparación de **Intermediario 32c**

(Escisión de HFIP a partir de la resina)

Una porción del **Intermediario 32b** (27 g, 9,37 mmol) se suspendió en DCM (300 ml) y se agitó durante 15 min. La resina se escurrió y después se trató con HFIP / DCM (3:7) (3 x 270 ml, 15 min cada vez). La solución de escisión se separó por filtración y se recolectó. La resina se lavó con DCM (3 x 300 mL). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. La resina peptídica se secó durante la noche bajo alto vacío a 35 ° C para proporcionar **Intermediario 32c-Lote1** (23,5 g, 9,37 mmol).

El procedimiento anteriormente mencionado se repitió con otra porción de **Intermediario 32b** (28,0 g, 9,72 mmoles), proporcionando **Intermediario 32c-Lote2** (26,1 g, 9,72 mmoles).

- Preparación de **Intermediario 32d**

(Acoplamiento en fase de solución de fenetilamina)

Se disolvieron **Intermediario 32c-Lote2** (20,0 g, 7,44 mmol, 1,0 eq) y HATU (5,23 g, 13,8 mmol, 1,85 eq) se disolvieron en DMF (400 ml). Se añadió una solución de fenetilamina (1,67 g, 13,8 mmol, 1,85 eq) en DMF (60 ml) y DIPEA.

La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y después se enfrió a 0 ° C y después se añadió salmuera (460 ml). La suspensión se agitó durante 10 min y después el producto se aisló por filtración. La torta de filtro se lavó con H_2O (300 ml), que luego se retiró cuidadosamente, después se disolvió en DCM (300 ml). La solución se secó sobre MgSO4 y después se concentró a sequedad al vacío. El producto crudo se sometió a cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyentes: DCM y DCM / iPrOH (8:2)) para proporcionar **Intermediario 32d-Lote1** (14,4 g, 6,6 mmol).

El mismo procedimiento se repitió con el **Intermediario 32c-Lote1** (23,4 g, 9,37 mmoles), con exclusión de la cromatografía ultrarrápida, proporcionando el **Intermediario 32d-Lote2** (28,0 g, 9,37 mmoles).

- Preparación de **Intermediario 32e**

(Eliminación del grupo protector)

Se disolvió **Intermediario 32d-Lote2** (28,0 g, 9,37 mmol) en TFA / DCM / EDT / TIS (90:5:2.5:2.5) (290 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

La solución de escisión se separó por filtración y se vertió sobre TBME frío (3 L) (0-4 ° C). La suspensión turbia se agitó en un baño de agua con hielo durante 30 min y después se filtró a través de un filtro de vidrio poro 4. El sólido blanco así obtenido se lavó con TBME (2 x 100 ml) después se secó al vacío a 35 ° C durante la noche para proporcionar el **Intermediario 32e-Lote1** (8,9 g, 5,9 mmol).

El mismo procedimiento se repitió con el **Intermediario 32d-Lote1** (14,4 g, 6,6 mmoles) proporcionando el **Intermediario 32e-Lote2** (9,6 g, 6,3 mmoles).

- Preparación de **Ejemplo 32***)*

1) Ciclización

Se disolvió **Intermediario 32e** (5,0 g, 3,3 mmol) en agua (500 ml). Una solución de yodo (1,18 g, 4,66 mmol, 1,41 eq) se añadió en ácido acético (93 ml) en una porción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió una solución de ácido ascórbico (1,03 g, 5,83 mmol, 1,77 eq) en agua (5,8 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 10 min, se filtró y se almacenó a 4 ° C hasta purificación.

El mismo procedimiento de ciclización se repitió hasta que 18,3 g (12,1 mmol) de **Intermediario 32e** habían sido procesados.

2) Purificación

Las soluciones de péptido cíclico se sometieron a HPLC preparativa en porciones de 0,5-5,0 g de péptido por inyección. Se agruparon las fracciones que tienen una pureza superior al 95% y se liofilizó para proporcionar una cantidad total de 4,89 g (3,2 mmol) de péptido purificado (sal de TFA).

3) Formación de acetato por intercambio iónico

Se colocó 75 g (100 ml) de una resina de intercambio de aniones fuerte (intercambiador de iones III, Merck) en su forma OH en filtro de vidrio sinterizado (porosidad 3) y luego se añadió una solución de ácido acético / agua (1:3) (300 ml), la suspensión se agitó manualmente durante 2 min y luego se drenó la resina. El proceso se repitió con otra porción de ácido acético / agua (1:3) (300 ml). La resina se lavó con agua desionizada hasta que se observó un drenado neutral. A continuación, la resina se transfirió a una columna de 4 x 20 cm equipado con un filtro de vidrio sinterizado (porosidad 3).

Se disolvió 4,8 g de péptido purificado en agua desionizada (50 ml) y se añadió a la columna. El producto se eluyó con agua desionizada (200 mL). El control de la elución del producto se realizó por siembra en una cromatografía de capa delgada, las fracciones enriquecidas se agruparon y se secaron por congelación para proporcionar el **Ejemplo 32** (4,1 g, 2,9 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico B; t_R = 8,01 min) y UPLC-MS (Método analítico D; medido: $[M+2H]^{2+}$=643.328; calculado:

$[M+2H]^{2+}$=643.324). El contenido de acetato de metilo era de 7,99-8,27% y el contenido de agua era de 1,94-1,96%.

Los otros ejemplos se sintetizaron en analogía:

- **Ejemplos 1** a **8**, **10**, **11**, **13** a **17**, **20**, **28** a **31** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 12**.
- **Ejemplos 19**, **26**, **27**, **36-38** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 18**.
- **Ejemplos 22-25**, **33-35** se sintetizaron en analogía al **Ejemplo 21**.

Ejemplos bioconjugados

Ejemplo 39: Albumina-PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) en donde en donde PPA es ácido 3-(piridin-2-ildisulfanil)propanoico

Paso 1: Retiro del recubrimiento de la albumina

- Retiro del recubrimiento con TCEP

A una solución de albúmina (500 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 10 ml de búfer 1x PBS en un tubo de 15 ml se añadió una solución de clorhidrato de TCEP (1,074 mg en agua purificada a grado biológico) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se desaló y se lavó con dos filtros de centrífugación Amicon Ultra-4 (30K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 4K g durante 40 minutos y los filtrados se desecharon. Se añadió 3 ml de agua purificada a grado biológico a cada filtro para cada lavado (centrifugada a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 3 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (~20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (500 mg).

El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico F; medido: 66439.0; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (2 mg) en 400 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo

de 2 ml se añadió una solución de ácido 6-maleimidohexanóico (13 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 2 h. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66649.0; esperado: 66648.

- Desprotección con DTT

A una solución de albúmina (400 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 5 ml de búfer PBS 1x en un tubo de 15 ml se añadió una solución de DTT (0,232 µl, 2mg/ml en agua purificada a grado biológico) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 2 h, luego, se desaló y se lavó con veinte filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se desecharon. Agua purificada a grado biológico se agregó en la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 6 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (~20 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (376 mg).

El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico G; medido: 66438.5; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (3 mg) en 400 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (25 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante la noche. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66608.0; esperado: 66606.

- Desprotección con Cisteína

A una solución de albúmina (120 mg, Aldrich, polvo liofilizado, a partir de suero humano) en 1 ml de búfer de PBS a 50 mM, pH 8,0 en un tubo de 2 ml se añadió cisteína (10,94 mg) una vez. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se

desaló y se lavó con dos filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 14K g durante 10 minutos y los filtrados se desecharon. Se añadió agua purificada a grado biológico a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 14K g durante 10 min) y el proceso de lavado se repitió 5 veces. El HSA desprotegido se disolvió en agua (4 ml en total). La solución se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, y se liofilizó para proporcionar un polvo cristalino (108 mg).

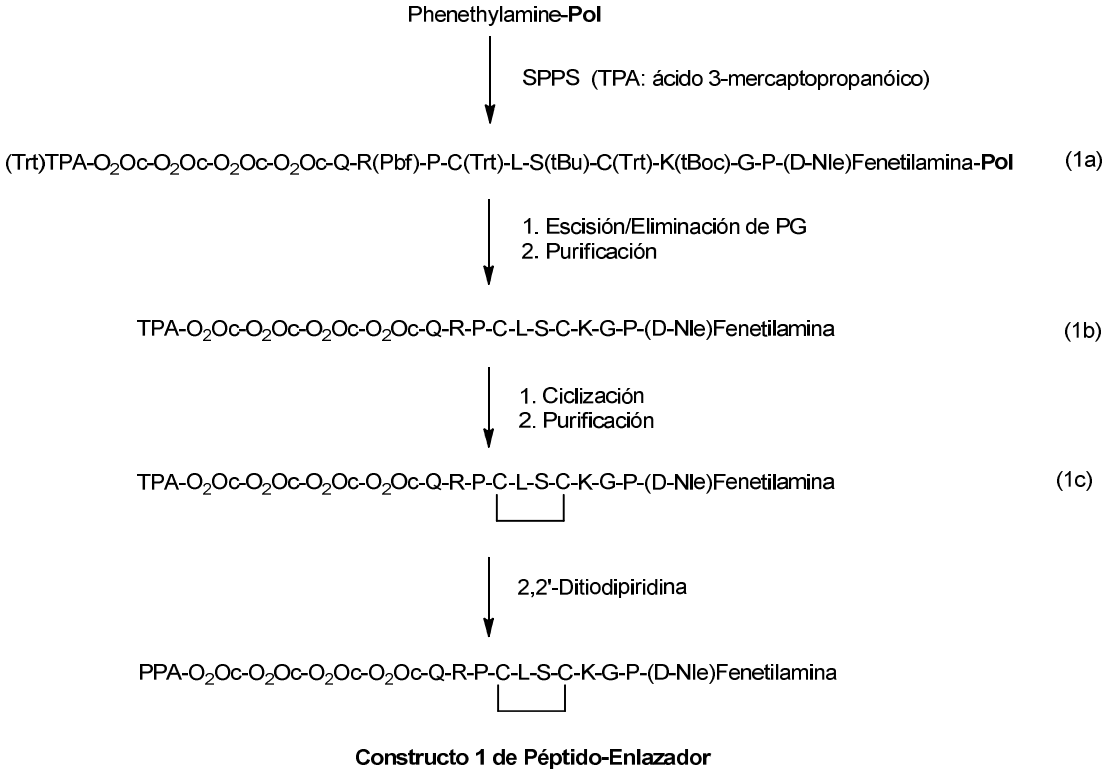
El producto puro se analizó por UPLC-MS (Método analítico G; medido: 66439; esperado: 66437).

- Determinación del número de grupo de tiol libre en HSA desprotegido

A una solución de este HSA desprotegido (3 mg) en 500 µL de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3-maleimidopropiónico (15 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h. UPLC-MS (Método analítico G) mostró unicamente la formación monoaducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66608.0; esperado: 66606.

Paso 2:

Síntesis del Constructo 1 de Péptido-Enlazador: PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) en donde PPA es ácido 3-(piridin-2-ildisulfanil)propanóico



Constructo 1 de Péptido-Enlazador

(SEQ ID NOS 63, 62, 62 y 62 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermediario 1a**

(Ensamblaje de péptido lineal) **O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62)**

- Resina de fenetilamina-AMEBA (89 mg, 0,25 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty$_{TM}$. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de	Temperatura	Potencia

		acoplamientos x Tiempo de reacción	ºC	Microondas
1	D-Nle	1 x 7,5 min	50	20
2	P	1 x 7,5 min	50	20
3	G	1 x 7,5 min	50	20
4	K(tBoc)	1 x 7.5 min	50	20
5	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
6	S(tBu)	1 x 7,5 min	50	20
7	L	1 x 7,5 min	50	25
8	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
9	P	1 x 7,5 min	50	25
10	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0
		2 x 7.5 min	50	25
11	Q(Trt)	1 x 7.5 min	50	25
12	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
13	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
14	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
15	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25
16	TPA(Trt)	1 x 7.5 min	50	25

- Preparación de **Intermediario 1b**

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

Una solución hecha de 1,54 g de DTT y 0,75 ml de tioanisol en 6 ml de TFA / TIPS / agua (95:2,5:2,5) se añade a **Intermediario 1a** (0,25 mmol) y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante 5 h. La solución de escisión se separa por filtración y la resina se lava con TFA acuoso al 95%. Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vierten lentamente sobre éter dietílico frío (1:1) (10-15 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se

centrifuga y el sobrenadante se vierte. Se añade éter dietílico al residuo, la suspensión se agita en vórtex durante 3 min, se centrifugó, y el sobrenadante se vierte fuera. El proceso de lavado se repite 3 veces. El sólido se seca en alto vacío. El producto en crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el **Intermediario 1b**.

- Preparación del **Intermediario 1c**

(Ciclización y purificación)

Intermediario 1b se disuelve en H_2O (2,0 ml). Se añade una solución de I_2 a 50 mM en AcOH (1.3 eq) en una porción a la solución agitada y la solución se agita durante la noche a temperatura ambiente y LCMS muestra la terminación de la reacción. Se añade ácido ascórbico a 0,5 M en H_2O para apagar el exceso de I_2. El producto en crudo se purifica por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H_2O para proporcionar el **Intermediario 1c**.

- Preparación del Constructo 1 de Péptido-Enlazador **Intermediario 1c**

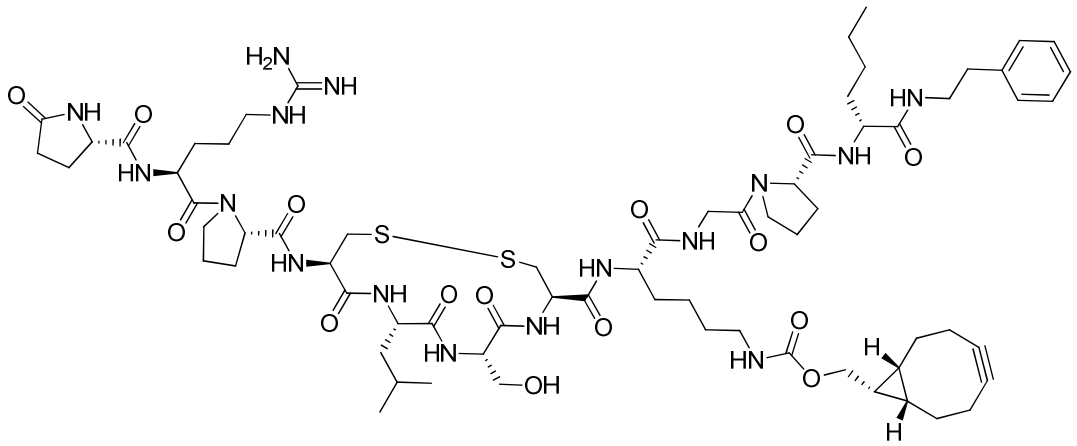
Una mezcla de **Intermediario 1c**, 2,2 '-ditiodipiridina (3 eq) en ACN se sacude a 25 ° C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluye con MeOH y se filtra. La solución se purifica por HPLC preparativa y se liofiliza a partir de ACN/H_2O para proporcionar **Constructo 1 de Péptido-Enlazador**.

<u>Paso 3: Conjugación del constructo de péptido-enlazador/ Albúmina</u>

Una solución de HSA desprotegido (100 mg) en búfer PBS (6 ml) se trata con una solución de PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 62) (2 eq en agua). La solución resultante se sacude a temperatura ambiente durante 1 h, luego, se desaló y se lavó con 4 filtros de centrífugación Amicon Ultra-0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugan a 13K g durante 10 minutos y los filtrados se desechan. Agua purificada a grado biológico se añade a la parte superior de cada filtro para cada lavado (centrifugado a 13K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repite 6 veces. El conjugado se disuelve en agua (4 ml en total). La solución se transfiere a un tubo Falcon de 15 ml, y se liofiliza para proporcionar el **Ejemplo 39**.

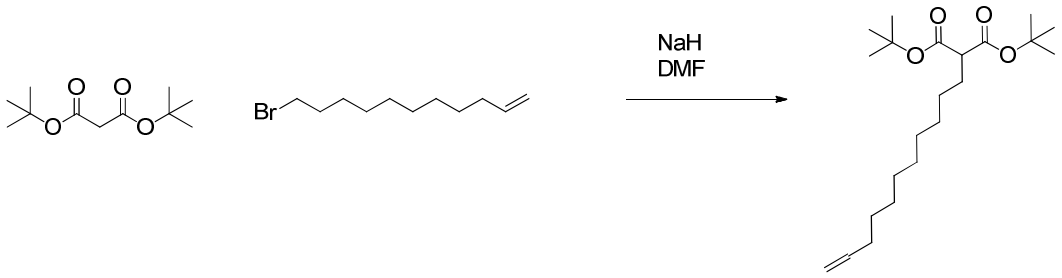
Ejemplo 40: Péptido cíclico de apelina conjugado con un ácido graso a través de un enlazador BCN-PEG:

Paso 1: Preparación de constructo de péptido cíclico de Apelina-BCN: Preparación de pE-R-P-C*-L-S-C*P-N_6[[(1α,8α,9α)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetoxi]carbonil]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 64)



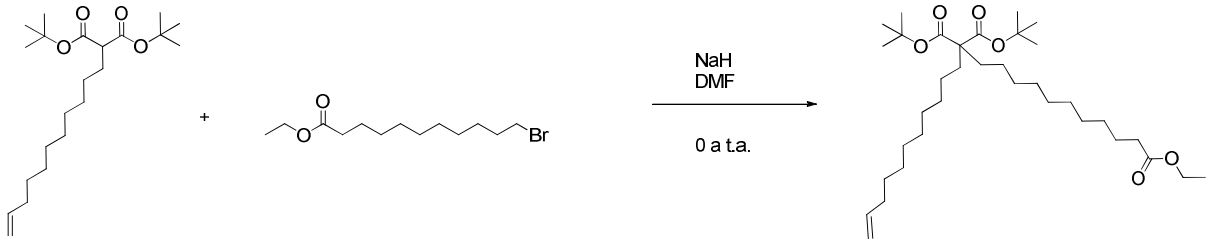
Una mezcla de pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) triacetato [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 50) (Ejemplo 32: 100 mg, 0,068 mmoles), bicarbonato de sodio (38 mg, 0,452 mmol) y agua (83 uL) en DMF (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación, se agregó carbonato de succinimidilo de (1R,8S)-biciclo [6.1.0] non-4-in-9-ilmetilo (Berry & Associates, 20 mg, 0,068 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se agregó 1 ml de aguaa la mezcla y la solución resultante se liofilizó para proporcionar un polvo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Paso 2: 2-(undec-10-in-1-il) malonato de di-terc-butilo



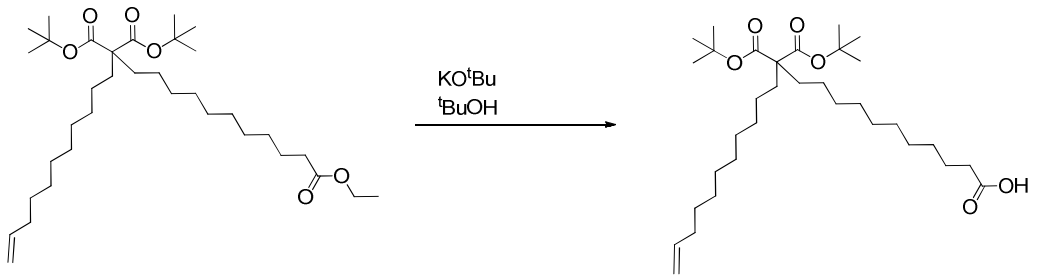
Malonato de di-terc-butilo (800 mg, 3,70 mmol) se disuelve en DMF (9 ml) a 0 ° C en atmósfera de N_2 y se añade NaH (148 mg, 3,70 mmol). La reacción se agita 30 minutos a 0 ° C y se añade 11-bromo-dec-1-eno (3,33 mmoles) por goteo lentamente, dando como resultado una solución de color amarillo. La reacción se agita a 0 ° C durante 2 horas y después se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. La mezcla se recoge en EtOAc (75 ml) y se lava con H_2O (25 ml). La capa acuosa se extrae con EtOAc (75 ml) y las capas orgánicas combinadas se secan sobre Na2SO4, se filtran y se concentran. La mezcla se purifica por columna ultrarrápida (12 g de cartucho de sílice, EtOAc / heptanos al 0-20%) y las fracciones se concentran para proporcionar el producto deseado.

Paso 3: docos-21-eno-1,11,11-tricarboxilato de 1-etilo de 11,11-di-terc-butilo



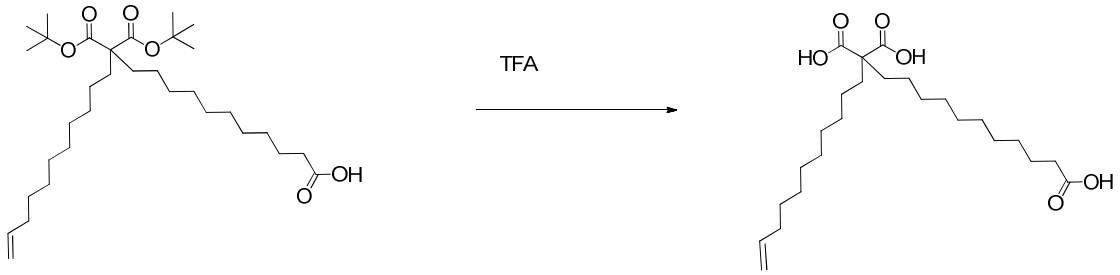
El compuesto del paso 2 (0,442 mmol) se disuelve en DMF (2 ml) a 0 ° C y se añade NaH (21,23 mg, 0,531 mmol). La reacción agitada a 0 ° C durante 15 minutos y 11-bromoundecanoato de etilo (143 mg, 0,486 mmol) se aagrega por goteo lentamente. La reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. La mezcla se diluye con EtOAc (40 ml) y se lava una vez con H_2O (25 ml). La capa acuosa se extrae una vez con EtOAc (40 ml) y las capas orgánicas se combinan, se secan sobre Na_2SO_4, se filtran y se concentran. La muestra se disuelve en 1 ml de DCM y se purifica por columna ultrarrápida (columna de sílice de 12 g, EtOAc / heptano al 0-20%, 15 min). Las fracciones se combinaron y se concentraron para proporcionar el producto deseado.

Paso 4: ácido 12,12-bis(tert-butoxicarbonil)tricos-22-enóico



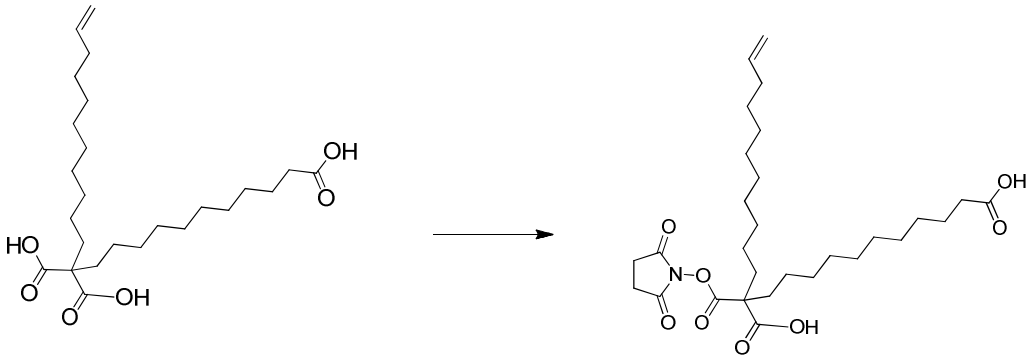
A una solución del compuesto de la etapa 3 (0,037 mmol) en $_t$BuOH (1 ml) se añade una solución de KOtBu (114 mg, 1,012 mmol) en $_t$BuOH (2 ml) a 30 ° C en atmósfera de N_2. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se monitorea por TLC (1:1 EtOAc / hexanos, $KMnO_4$, reflujo). Después de que se completa la reacción, la mezcla de reacción se inactiva con HCl 1 M (20 ml) y se extrajo dos veces con EtOAc (25 ml). Las capas orgánicas se recolectan y se secan sobre Na_2SO_4, se filtra, y se concentra. El material se llevó al siguiente paso sin purificación adicional.

Paso 5: Ácido docos-21-ene-1,11,11-tricarboxílico



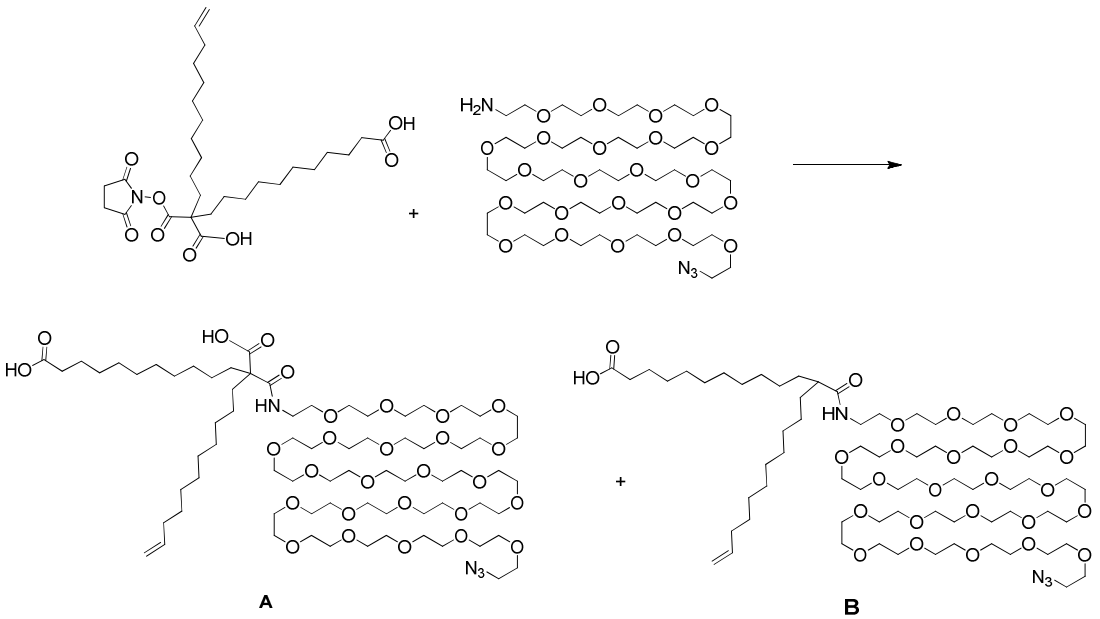
TFA (2 ml) se añade a un compuesto del paso 4 (0,022 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se diluye con DCM (10 ml) y se concentra. El material se recoge en EtOAc (10 ml) y se lava con H_2O (20 ml). Las capas orgánicas se recolectan y se secan sobre Na_2SO_4, se filtran, y se concentran. El material crudo se disuelve en 1 ml de MeOH y se purifica mediante HPLC desencadenado por MS (columna de Sunfire 30x50mm 5 um ACN/H_2O W / TFA al 0,1% 75ml/min, inyección de 1,5 ml, ACN al 45-70% durante 3,5 min).

Paso 6: Ácido 2-(((2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi) carbonil)-2-(undec-10-en-1-il)tridecanodióico



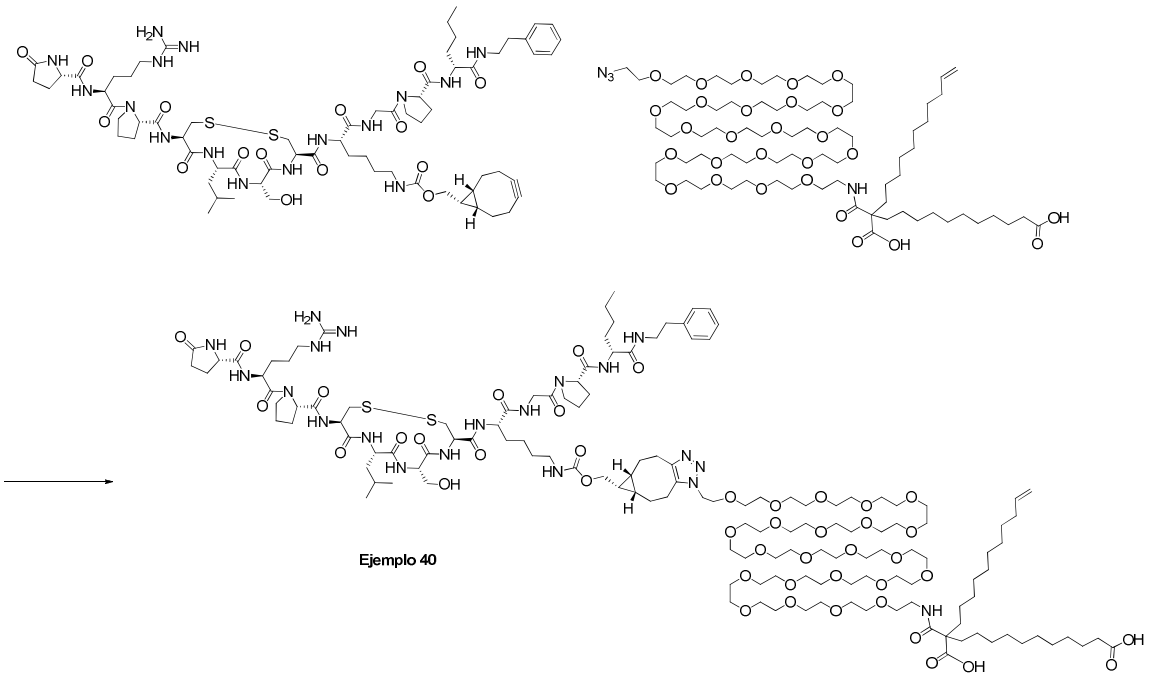
DCC (187 mg, 0.908mmol) en DCM (2 ml) se añadió a una solución de N-hidroxisuccinimida (99 mg, 0.862mmol) y ácido docos-21-ene-1,11,11 tricarboxílico (Intermediario 45: 400 mg, 0.908mmol) en DCM (7 ml) y THF (0,7 ml). La reacción se agitó durante la noche antes de que el disolvente se evaporara. El residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm; ACN 55-80% / agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título (155 mg, 0.288mmol, 32%): por LCMS Método E Rt = 1.51min, M + H 538.3; ^{1}H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 1,16-1,46 (m, 28 H) 1,60-1,87 (m, 3 H) 1,91-2,17 (m, 5 H) 2,38 (t, J = 7,03 Hz, 2 H) 2,86 (s ancho, 4 H). 3,68 (dd, J = 11,25, 7,34 Hz, 1 H) 3,78 (dd, J = 11,31, 5,20 Hz, 1 H) 3,99-4,10 (m, 1 H).

Paso 7: enlazador de PEG con ácido graso



Azido-dPEG23-amina (Quanta Biodesign: 164 mg, 0.149mmol) y compuesto de la etapa 6 (80 mg, 0.149mmol) se disolvieron en THF (2,5 ml). Se añadió DIPEA (39µL, 0.233mmol) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm; ACN al 45-70%/ agua + TFA al 0,1%) para proporcionar compuestos A (97 mg, 0.061mmol, 41%) y B (32 mg, 0.021mmol, 14%): LCMS ZQ1 Método E Rt = 1.35min, $[M+2H]_{+2}$ 761,9; ^{1}H RMN (400 MHz, ACETONITRILO-*d3*) δ ppm 1.5 a 1.18 (m, 3 H) 1,19-1,32 (m, 20 H) 1,36 (t, J = 7,15 Hz, 1 H) 1,48-1,59 (m, 2 H) 1,65-1,75 (m, 2 H) 2,01-2,06 (m, 2 H) 2,25 (t, J = 7,46 Hz, 2 H) 3,33-3,39 (m, 2 H) 3,39-3,44 (m, 2 H) 3,50-3,67 (m, 98 H) 4,84-4,95 (m, 1 H) 4,95-5,06 (m, 1 H) 5,83 (ddt, J = 17,07, 10,29, 6,68, 6,68 Hz, 1 H) 7,31 (t, J = 5,44 Hz, 1 H); Método LCMS E Rt = 1.50min, [M +2 H] 2 739,9; 1H RMN (400 MHz, ACETONITRILO-*d3*) δ ppm 1,16-1,42 (m, 30 H) 1,42-1,63 (m, 5 H) 2,00-2,07 (m, 2 H) 2.22 a 2.28 (m, 2 H) 2,40-2,52 (m, 2 H) 3,25-3,33 (m, 2 H) 3,33-3,42 (m, 2 H) 3,42-3,50 (m, 2 H) 3,50-3,68 (m, 88 H) 4,86-5,06 (m, 2 H) 5,83 (ddt, J = 17,04, 10,26, 6,71, 6,71 Hz, 1 H) 6,40-6,74 (m, 1 H).

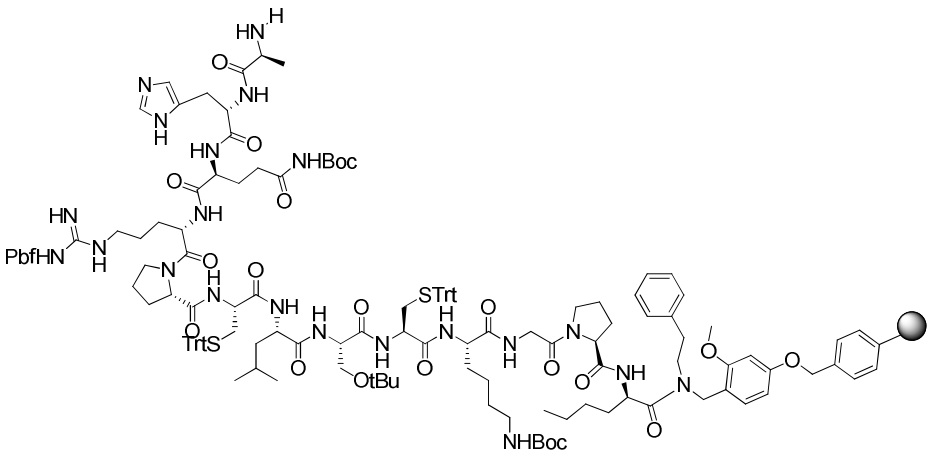
Paso 8: Preparación de Ejemplo 40:



Una mezcla de pE-R-P-C*-L-S-C*-N^6-[[(1α,8α,9α)-bicIclo[6.1.0]non-4-In-9-ilmetoxi]carbonil]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) [C4-C7 disulfuro] (SEQ ID NO: 64) (50 mg del producto de del paso 1 en 1 ml de agua, 0,034 mmoles) y el compuesto A del paso 7 (52 mg, en 268 ul de agua) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La mezcla de reacción se purificó luego por HPLC preparativa (columna Sunfire 30x50mm 5 um ACN/H2O w / 0,1% de TFA 75ml/min, ACN al 15-40% 5 min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar el producto del título como sal de TFA (24 mg, 21%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + Ácido Fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 5,15 min): Tiempo de retención: 2,77 min; MS $[M+2]_{2+}$: observado: 1491.8808, calculado: 1491,8560.

Ejemplo 41: Péptido cíclico de apelina conjugado con un ácido graso en el extremo N

Paso 1: Síntesis de A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetil amina (SEQ ID NO: 65) **Intermediario 41a**



Resina fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,1 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM Liberty Blue Microwave) con Arg doble estándar para residuos de Arg y tiempo doble acoplado a DNle. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se define como sigue:

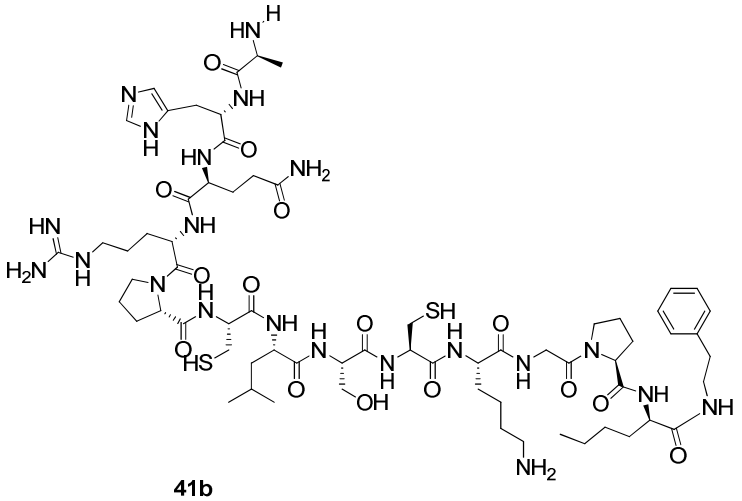
- Acoplamiento de aminoácidos: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 X 7 mL)
- Desprotección Fmoc: Piperidina al 20%/HOBt a 0.1 M (2 x 7 mL)
- Lavado: DMF (4 x 7 mL luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 ml) y DCM (2 x 50 ml) después se secó al vacío para proporcionar el **Intermediario 41a** (276 mg, 0,1 mmol).

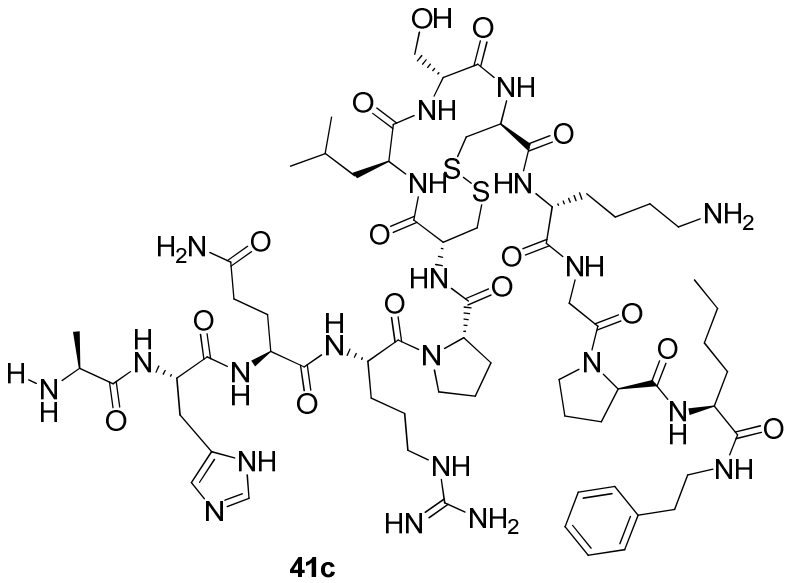
Paso 2: Preparación de **Intermediario 41b** (Escisión del péptido de la resina)



41b

Intermediario 41a (276 mg, 0,1 mmoles) se combinó con 4 ml de solución de TFA (37 ml de TFA, 1 ml de H_2O, 1 ml de TIPS, 3,06 g de DTT) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 ml de Et_2O frío. La solución se agitó en vórtice y se deja reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et_2O frío (40 ml cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó al vacío durante la noche dando **Intermediario 41b-lote 1** (17,4 mg, 0,012 mmol). LCMS (producto de análisis SQ2-Peptídico-Acídico-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 1.83 minutos, MS [M+H] 1513.5.

Paso 3: Preparación de **Intermediario 41c** (Ciclización de residuos de cisteína)

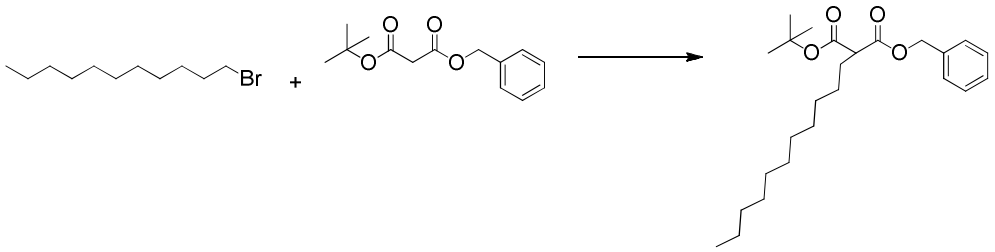


41c

Se disolvió **Intermediario 41b-lote 1 y 2** (29,6 mg, 0,020 mmol) en agua (3 ml) y 10 gotas de DMSO para proporcionar una solución ligeramente turbia. Se añadió yodo (50 mM en HOAc, 0,783 ml, 0,039 mmol) por goteo lentamente y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante la noche. El análisis de LCMS de la reacción cruda mostró la conversión completa del material de partida. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M por goteo hasta que el color se disipó. El material se purificó por HPLC activado por MS. La liofilización de las fracciones agrupadas dio 7 mg del producto deseado como un polvo blanco (4,63 µmol, 24%).

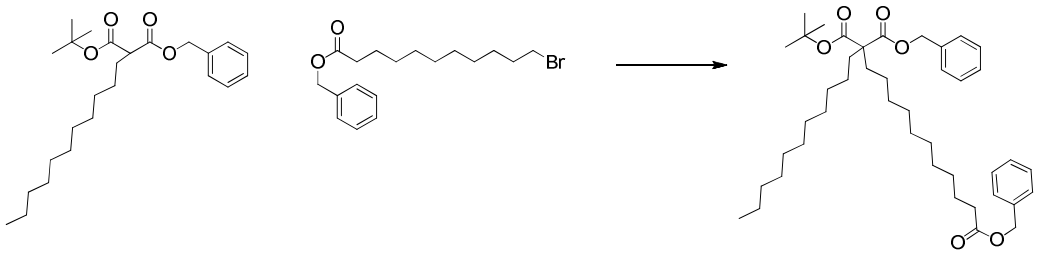
LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 0.90 minutos, MS [M+H] 1511.8.

Paso 4: 3-Terc-butil-2-undecilmalonato de 1-bencilo



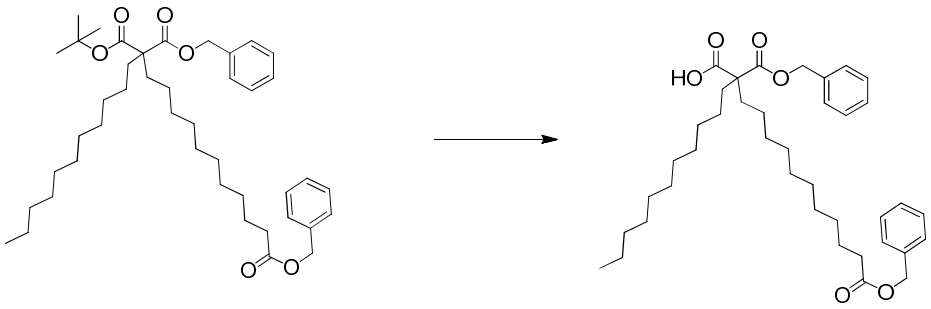
A una suspensión de NaH (160 mg, 4,0 mmoles) en DMF (8 ml) a 0 º C bajo atmósfera de N_2, se añadió malonato de terc-butilo de bencilo (1,0 g, 4,0 mmoles) en DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 50min después de lo cual se añadió 1-bromoundecano en DMF (2 ml). Después de una hora adicional de agitación, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo durante la noche. Et_2O (100 ml) y agua (20 ml) se añadieron a la partición de la reacción. La fase acuosa se extrajo con Et_2O (100 ml), y los orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (C18 12 g, ACN al 40-100%/ agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (1,14g, 2.82mmol, 71%): LCMS Método F Rt = 1.58min, M + Na 427.4; $_1$H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84-0,96 (m, 3 H) 1,28 (br. s, 12 H) 1,31 (m, J = 3,90 Hz, 6 H) 1,41 (s, 9 H) 1,88 (q, J = 7,38 Hz, 2 H) 3,29 (t, J = 7,58 Hz, 1 H) 5,19 (q, J = 12,27 Hz, 2 H) 7,30-7,42 (m, 5 H).

Paso 5: Docosano-1,11,11-tricarboxilato de 11-terc-butilo de 1,11 dibencilo



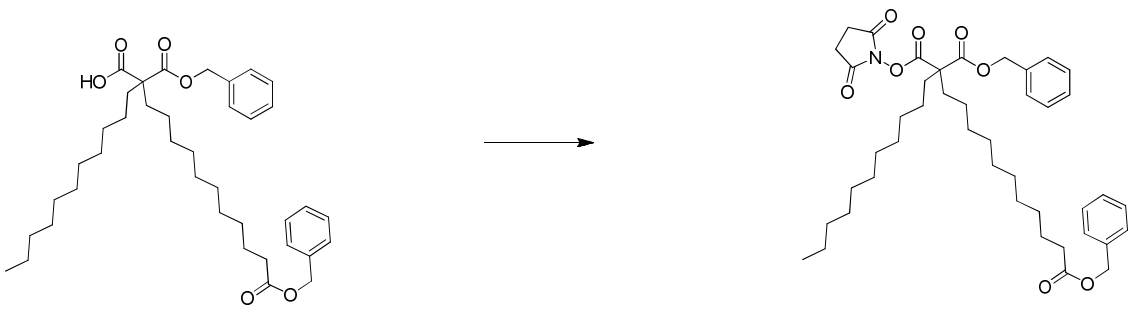
El compuesto del título se sintetizó de una manera similar al paso 3 del Ejemplo 40 utilizando el compuesto de la etapa 4 (177 mg, 0.284mmol) como material de partida para producir un aceite incoloro (153 mg, 0.213mmol, 75%): $_1$H RMN (400 MHz , CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 1.12 a 1.21 (m, 2 H) 1,21-1,37 (m, 30 H) 1.66 (quin, J = 7,40 Hz, 2 H) 1,89-2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, J = 7,58 Hz, 2 H) 2,84 (br. s, 4 H.) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30-7,47 (m, 10 H).

Paso 6: Ácido 13- (benciloxi)- 2-((benciloxi) carbonil)- 13- oxo- 2- undeciltridecanóico



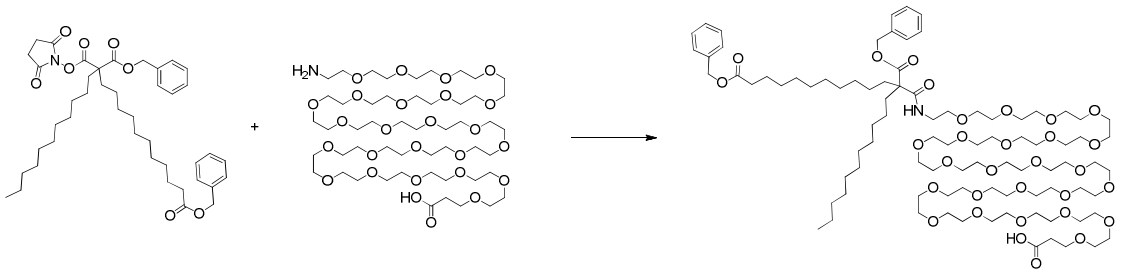
A una solución de un compuesto de la etapa 5 (200 mg, 0.295mmol) en DCM (3 ml) se añadió TFA (0,6 ml), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (sílice 12 g, EtOAc / HEP al 0-15%) para proporcionar el compuesto del título (177mg, 0.284mmol, 96%): ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0.87-0.94 (m, 3 H) 0.94-1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23-1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.78-1.91 (m, 2 H) 1.93-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31-7.44 (m, 10 H).

Paso 7: Docosano-1,11,11-tricarboxilato de 11-(2,5-dioxociclopentilo) de 1,11-dibencilo



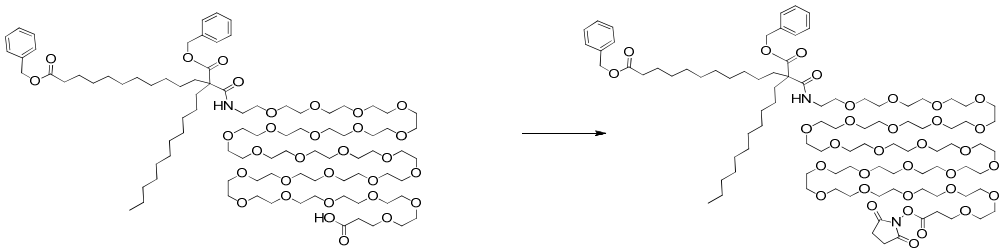
El compuesto del título se sintetizó de una manera similar al paso 6 del Ejemplo 40 utilizando el compuesto de la etapa 6 (177 mg, 0.284mmol) como material de partida para producir un aceite incoloro (153 mg, 0.213mmol, 75%): $_1$H RMN (400 MHz , CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 1.12 a 1.21 (m, 2 H) 1,21-1,37 (m, 30 H) 1.66 (quin, J = 7,40 Hz, 2 H) 1,89-2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, J = 7,58 Hz, 2 H) 2,84 (br. s, 4 H.) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30-7,47 (m, 10 H).

Paso 8:



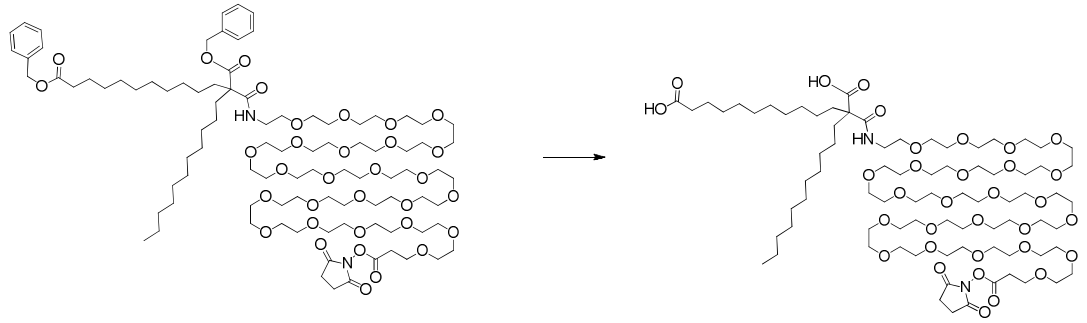
Una solución del Intermediario **34** (145 mg, 0.201mmol) en THF (1,5 ml) y DCM (1,5 ml) se añadió a un vial cargado con amino-PEG24-ácido. Se añadió DIPEA (88µL, 0.504mmol) y la reacción se agitó en un agitador de placas durante 15 hrs. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía de fluido supercrítico (Waters HILIC 20x150mm; MeOH al 15-25% / CO2) para proporcionar el Intermediario **35** (151 mg, 0.086mmol, 43%): LCMS Método E Rt = 1.30min, [M+2H]+2 876.4; ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0.86-0.93 (m, 3 H) 0.93-1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23-1.37 (m, 15 H) 1.61-1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52-3.59 (m, 2 H) 3.59-3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31-7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H).

Paso 9:



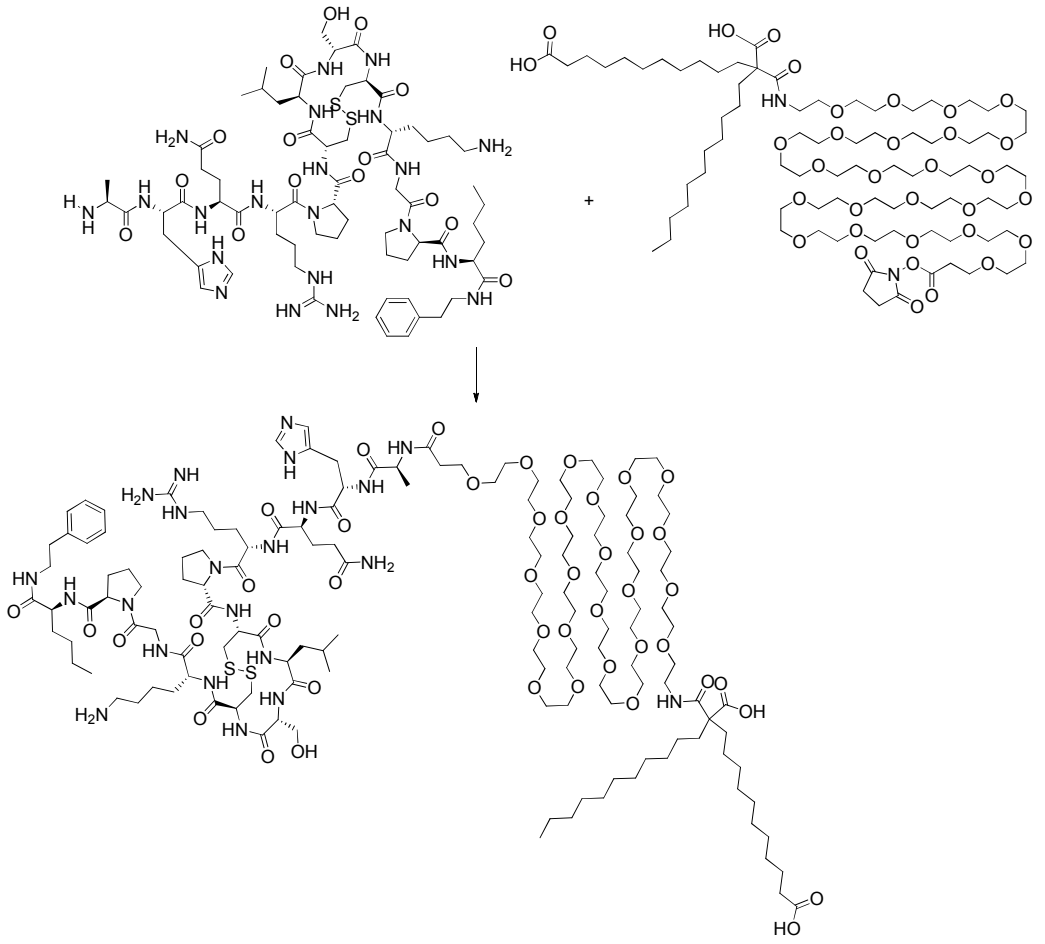
DCC (22mg, 0.103mmol) en DCM (2 ml) se añadió a una solución de Intermediario **35** (150mg, 0.086mmol) y N-hidroxisuccinimida en DCM (1,5 ml). La reacción se agitó durante 1.5 horas. Se añadió N-hidroxisuccinimida adicional (10 mg) en THF (0,5 ml) y DCC (22 mg) en DCM (0.265mL) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por columna ultrarápida (sílice 12, EtOAc al 0-5% / HEP) para proporcionar el Intermediario **36** (159mg 96%) como un sólido blanco: LCMS Método G Rt = 1.55min, $[M+H_3O+H]^{+2}$ 933.9 .

Paso 10:



A una solución del compuesto de la etapa 9 (159 mg, 0.086mmol) en THF (5 ml) se le añadió una suspensión de Pd al 10% sobre carbono (4,6 mg, 4,3 µol) en THF (1 ml). La reacción se colocó bajo hidrógeno y se agitó durante 40min. Se añadió más Pd sobre carbono (7 mg, 6,5µmol) y luego se agitó durante otra 1 hora bajo atmósfera de hidrógeno. La reacción se hizo pasar a través de un filtro de membrana y el filtrado se evaporó. El residuo se purificó por HPLC (Sunfire C18 30x50mm, ACN al 45-70% / agua + TFA al 0,1%) para proporcionar el compuesto del título (83 mg, 0.047mmol, 54%): LCMS Método G Rt = 1.03min, [M+2H]+2 835.2; ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δppm 0.84-0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21-1.39 (m, 30 H) 1.57-1.68 (m, 2 H) 1.69-1.80 (m, 2 H) 1.97-2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 3.51-3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 7.45 (t, *J*=4.46 Hz, 1 H)

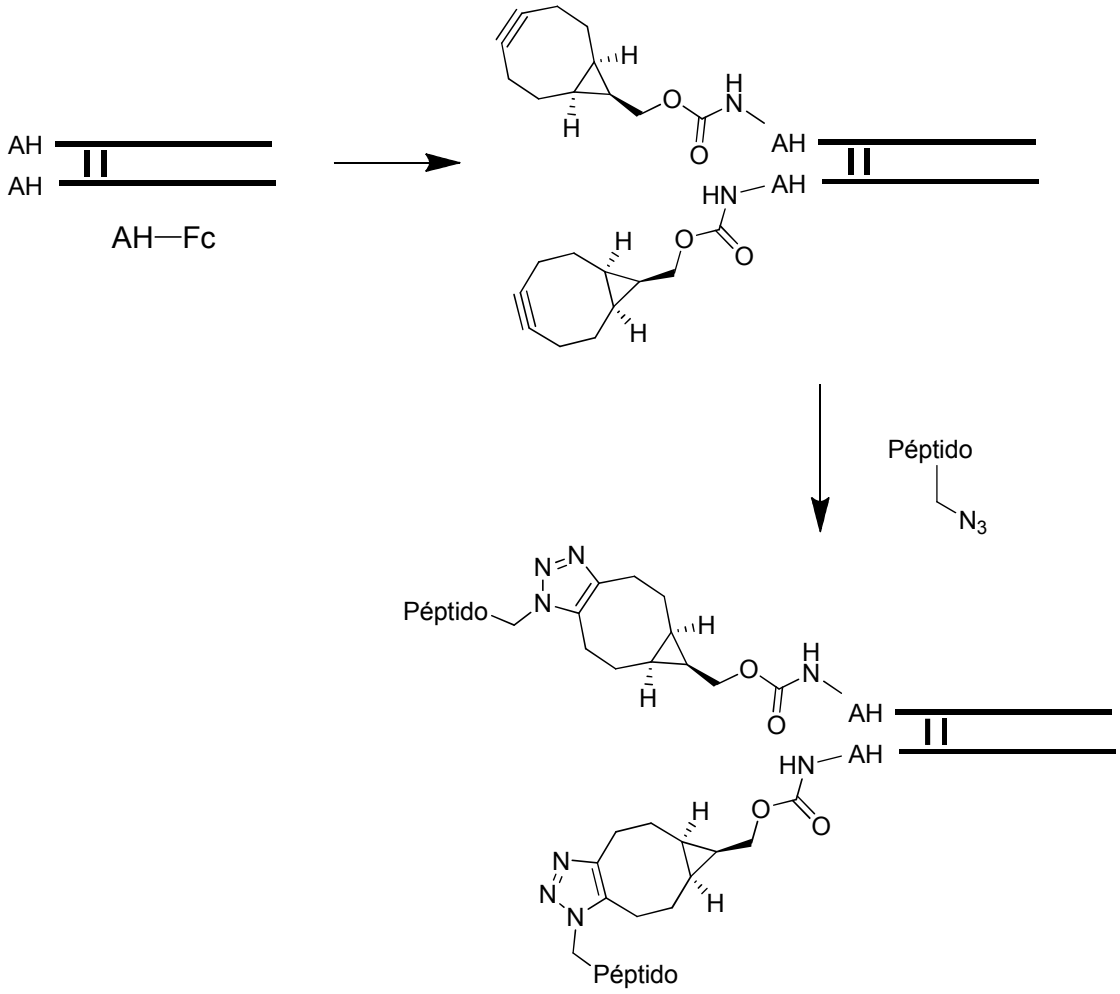
Paso 4: Preparación de conjugado que comprende constructo de Apelina amina de A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetil (SEQ ID NO: 65) y constructo de ácido graso-PEG (conjugación de extremo N)- Ejemplo 41



Una solución de 10 mg / ml de ácido graso-NHS (producto A del paso 7 del Ejemplo 40) se preparó en H_2O. Se añadió **Intermediario 41c** (1,5 mg, 0,993 µmol) se disolvió en 30 mM de búfer de NaOAc pH 4 (672 µl) y ácido NHS-graso (0,850 ml, 5,10 mmol). La reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas en cuyo punto se agregó 1,5 mg adicionales de ácido graso-NHS (10 mg / ml en H_2O) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadieron 8 mg de ácido graso-NHS (10 mg / ml en H_2O) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 días y se añadió 1,7 mg de NHS-ácido graso (10 mg / ml en H_2O). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se purificó por HPLC activada por M para proporcionar 1,7 mg del compuesto del título como un polvo blanco (0,510 µmol, 51%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 3.87 minutos, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9.

Ejemplo 42: Conjugación de AH-Fc con péptido cíclico de apelina

Esquema General



Paso 1: preparación de constructo de AH-Fc:

Clonación de Constructo:

Un fragmento de ADN que contiene al péptido señal de la cadena kappa de la IgG de ratón seguido de una secuencia de Fc humana y una secuencia bis corta de aminoácidos (AH) fue el codon optimizado mediante la síntesis del gen (GeneArt) con los sitios de restricción 5'-NheI y 3'-EcoRI. La secuencia resultante se digirió con restricción con NheI y EcoRI y se ligó en los sitios NheI y EcoRI de vector pPL1146, corriente abajo de un promotor de CMV. La ligación se transformó en células E. coli DH5α y colonias que contienen el inserto correcto

se identificaron por secuenciación de ADN. La secuencia mostrada es para la cadena con sentido y corre en la dirección 5 'y 3'.

AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCA
GCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAG
ACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTC
TCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCAT
AATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTG
TCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCA
AAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAA
AGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAAT
GACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC
ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACA
CCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGA
TAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGC
CCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGAA
TTC (SEQ ID NO: 66)

Secuencia del constructo AH-Fc:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG **AH**DKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 67)

Expresión y Purificación de Proteínas de AH-Fc:

ADN plásmido de expresión de AH-Fc se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1 x 10_6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) en matraz de 3 L durante 4 días a 37 ° C.

La proteína de AH-Fc se purificó a partir de medio condicionado clarificado. Brevemente 500 ml de medio condicionado se hizo fluir a través de una columna HiTrap MabSelect SuRE de 5 ml (GE Life Sciences) a 4 ml / min. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-114 al 0,1% y luego la proteína de AH-Fc se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, neutralizado con Tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. Los rendimientos de proteína fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio acondicionado y los niveles de endotoxinas eran <1 EU/ mg, medidos por la prueba de Charles River ENDOSAFE PTS.

Control de Calidad de Proteínas de AH-Fc:

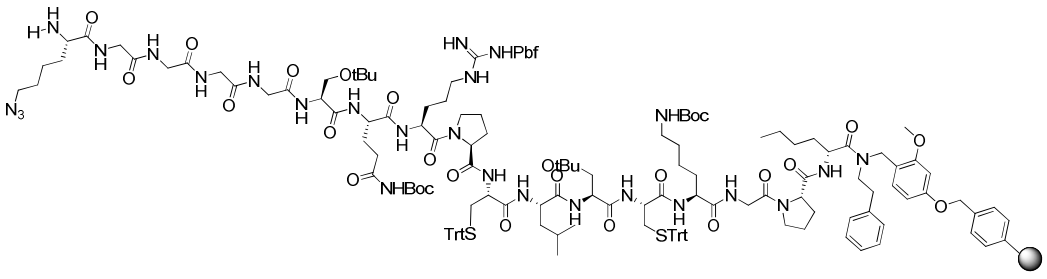
LC / MS de proteínas de AH-Fc: Los picos fueron heterogéneos y aproximadamente 3 kDa mayores a lo esperado para los dímeros. Esto es característico de glicosilación ligada a N esperada para Fc que tiene un sitio de glicosilación ligada a N de consenso.

LC / MS de proteínas AH-Fc reducidas, N-desglicosiladas por N: proporcionó picos agudos. El peso molecular de AH-Fc fue como se esperaba. Las cisteínas en el extremo C parecen proteger la proteína de la escisión.

Exclusión por tamaño analítica en Superdex 200: Las proteínas de apelina Fc tienen entre 89 y 100% de dímero, 0 a 10% de tetrámero, y 0 a 1% de agregado.

SDS/PAGE de reducción: Todas las proteínas emigraron predominantemente como monómeros del tamaño esperado.

Paso 2: Síntesis de NH_2-AzidoLys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Fenetilamina (SEQ ID NO: 68)



Resina fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,25 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM Liberty Blue Microwave) con Arg doble estándar para residuos de Arg y D-Nle y tiempo doble

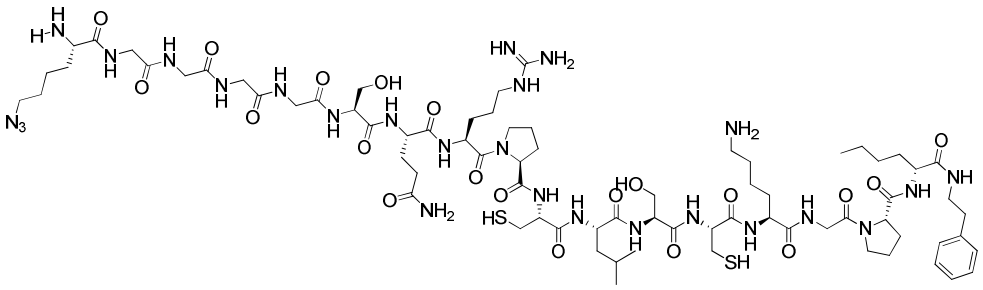
acoplado a Azidolisina. Los aminoácidos se prepararon como solución a 0,2 M en DMF. Un ciclo de acoplamiento estándar se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 X 7 mL)
- Desprotección Fmoc: Piperidina al 20%/HOBt a 0.1 M (2 x 7 mL)
- Lavado: DMF (4 x 7 mL luego 1 x 5 mL)

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción (Temp)	Método de Acoplamiento
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-AzidoLys-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU

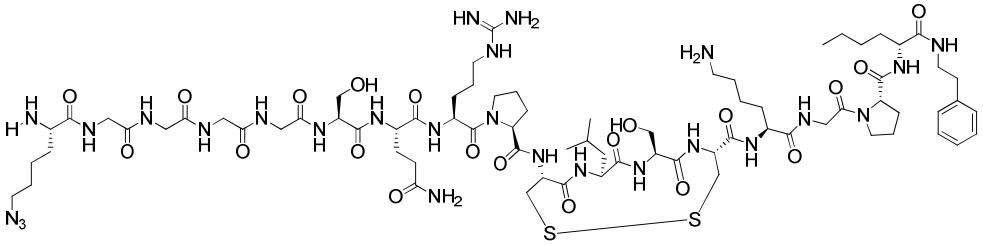
Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (2 x 50 ml) y DCM (2 x 50 ml) después se secó al vacío para proporcionar el **Intermediario 42a** (770 mg, 0,250 mmol).

Paso 3: Preparación de **Intermediario 42b** (Escisión del péptido de la resina)



Intermediario 42a (770 mg, 0.250, mmoles) se dividió en la mitad y cada muestra se combinó con 6 ml de solución de TFA (37 ml de TFA, 1 ml de H_2O, 1 ml de TIPS, 2,569 g de (20 eq.) DTT) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se separó de la resina y se precipitó en 40 ml de Et_2O frío. La solución se agitó en vórtice y se deja reposar sobre hielo durante 10 minutos antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó dos veces más con Et_2O frío (40 ml cada vez), se centrifugó (5 minutos cada vez) y se decantó. El sólido se secó bajo vacío durante la noche y se purificó por HPLC activada por M proporcionando el **Intermediario 43b** como un polvo blanco (80 mg, 0,045 mmol, 80%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 2.32 minutos, MS [M+H+2/2] 888.0.

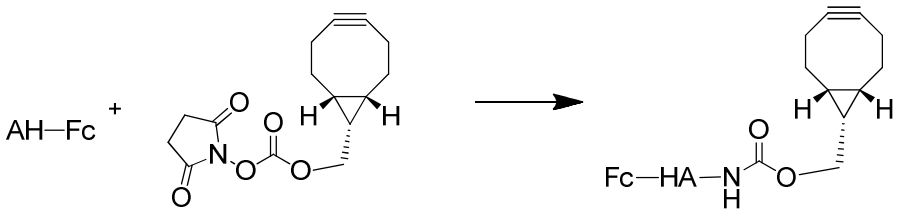
Paso 4: Preparación de **Intermediario 42c** (Ciclización de residuos de cisteína)



Intermediario 42b (80 mg, 0,045 mmoles) se disolvió en agua (1,25 ml) y se añadió yodo (50 mM en HOAc, 1,804 ml, 0,090 mmol) lentamente por goteo y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 horas. El análisis de LCMS de la reacción cruda mostró la conversión completa del material de partida. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M por goteo

hasta que el color se disipó. El material se purificó por HPLC activado por MS. La liofilización de las fracciones agrupadas dio 20,1 mg del producto deseado como un polvo blanco (0,045 mmol, 25%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, columna Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 m, 2,1 mm x 50 mm, 50 ° C): R_t = 2.17 minutos, MS [M+H+2/2] 886.8.

Paso 5: Preparación de **Fc-AH BCN** (*Instalación de un click de manipulación en el extremo N de AH-Fc*)

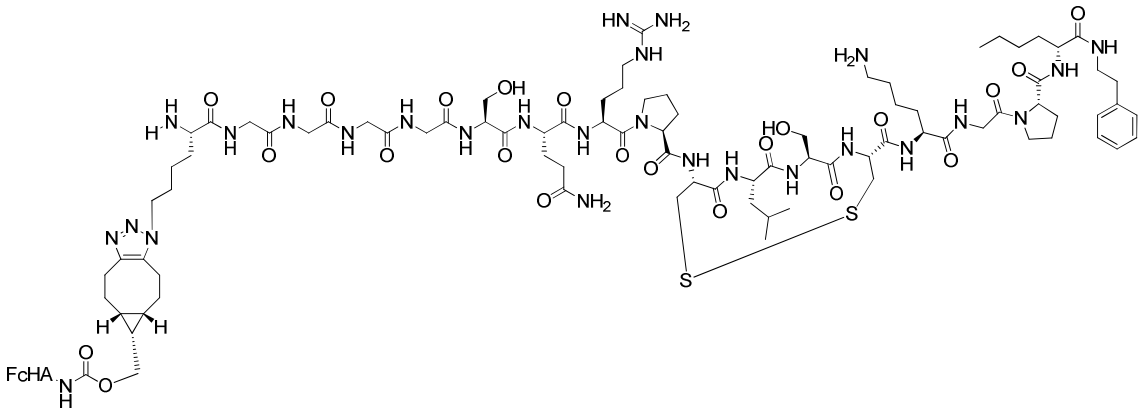


Fc-AH (del paso 1: 1 mL, 3 mg/mL, 0.117 µmol) se disolvió en 30 mM NaOAc pH 4.0 (4.3 mL) y una solución concentrada de 10mg/mL de (1R,8S,9s)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (BCN) en DMSO (0.70 mL) se agregó lentamente y la reacción se colocó sobre agitador de placas a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió BCN (0,25 ml) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió BCN (0,70 ml) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución se intercambió en NaOAc a 30 mM pH 4,0 usando filtro de centrifugación MWCO Amicon de 10 kDa mediante la dilución y la concentración de la reacción 5 veces a un volumen de 900 µl. La solución se centrifugó y el sobrenadante se eliminó. Se midió mediante A280 que la concentración era de 1,73 mg / ml (1,56 mg, 26%). LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0.1%, 2-98% durante 2 min) R_t = 1.58 min.

Grado de Etiquetado	Calculado	Observado	% TIC (MS+) Intensidad
AH-Fc	51141	51141,5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31

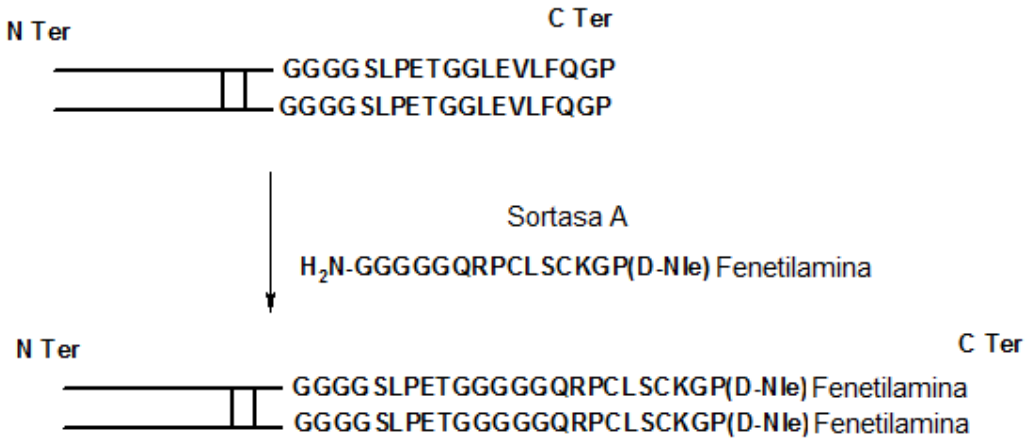
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

Paso 6: Preparación de ejemplo 42: Fc-HA-BCN conjugado a Intermediario 43c



Se preparó una solución concentrada de 50 mg / ml de **Intermediario 42c** en H_2O. Se añadió **Intermediario 43c** (53,7 µl, 1,515 µmol) a una solución concentrada de **Fc-HA-BCN (del paso 5)** en NaOAc a 30 mM pH 4.0 (1,73 mg / ml, 1,56 mg, 0,030 µmol) y la reacción se mezcló a temperatura ambiente durante 16 horas. La solución se intercambió en NaOAc a 30 mM pH 4,0 usando filtro de centrifugación MWCO Amicon de 50 kDa mediante la dilución y la concentración de la reacción 5 veces a un volumen de 250 µl. Se midió mediante A280 que la concentración era de 3,32 mg / ml (830 µg, 50%). LCMS (QT2, Protein_35-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: CAN + Ácido Fórmico al 0.1%, 10-80% durante 2 min) R_t = 1.43 min, MS [M(glicosilado)+H] 54524.5.

Ejemplo 43: Conjugado Fc-apelina usando Sortasa: (SEQ ID NOS 69, 69, 70, 71 y 71 respectivamente, en orden de aparición)



Paso 1: preparación de constructo de Fc-Sortasa:

Clonación de Constructo:

Un fragmento de ADN que contiene el péptido de señal de la cadena kappa de Ig de ratón seguido de un Fc humana y una secuencia de reconocimiento de sortasa (LPXTG) (SEQ ID NO: 72) fue optimizada en codones por síntesis de genes (GeneArt) con 5'-NheI y sitios de restricción de 3'-EcoRI. La secuencia resultante se digirió con restricción con NheI y EcoRI y se ligó en los sitios NheI y EcoRI de vector pPL1146, corriente abajo de un promotor de CMV. La ligación se transformó en células E. coli DH5α y colonias que contienen el inserto correcto se identificaron por secuenciación de ADN. La secuencia mostrada es para la cadena con sentido y corre en la dirección 5 'y 3'.

Fc-sortasa

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTG
GGTGCCAGGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCT
GAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC
TGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGA
GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGT

GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG
CCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGAC
CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC
GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCC
CCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACA
AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGGCG
GAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCCTAAGA
ATTC (SEQ ID NO: 73)

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGLEVLFQGP* (SEQ ID NO:74)

Expresión y Purificación de Proteínas:

ADN plásmido de expresión de Fc-sortasa se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1 x 10_6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) en matraz de 3 L durante 4 días a 37 ° C.

La proteína de Fc-sortasa se purificó a partir de medio condicionado clarificado. Brevemente, 500 ml de medio condicionado se hizo fluir a través de una columna HiTrap MabSelect SuRE de 5 ml (GE Life Sciences) a 4 ml / min. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna de PBS que contenía Triton X-114 al 0,1% y luego la proteína de Fc-sortasa se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, neutralizado con Tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. Los rendimientos de proteína fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio acondicionado y los niveles de endotoxinas eran <1 EU/ mg, medidos por la prueba de Charles River ENDOSAFE PTS.

Control de Calidad de Proteínas de Fc-Sortasa:

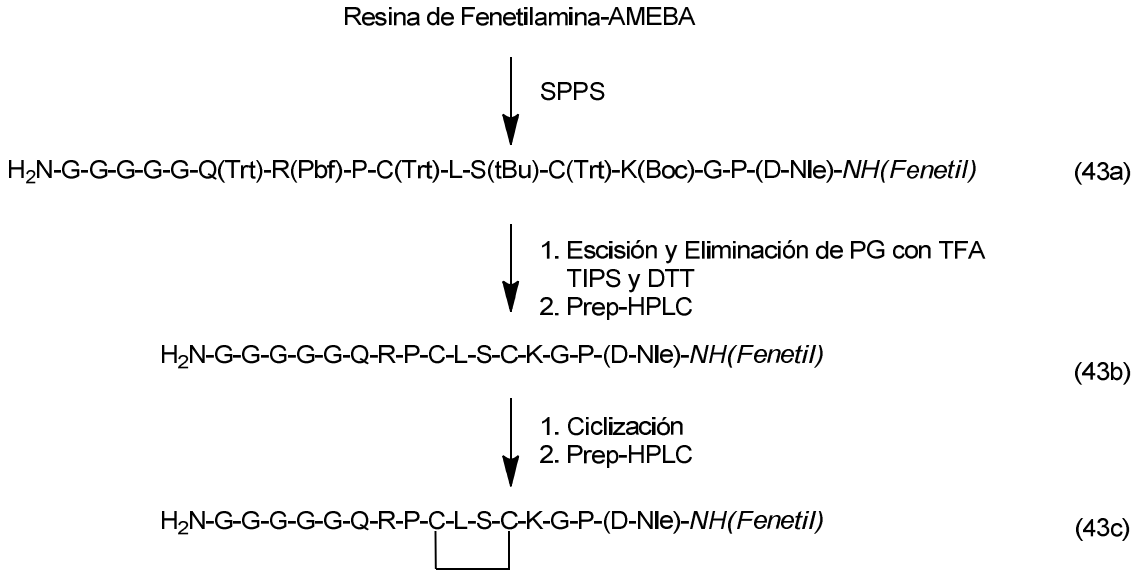
LC / MS de proteína de Fc-sortasa nativa: El pico fue heterogéneo y aproximadamente 3 kDa mayores a lo esperado para los dímeros. Esto es característico de glicosilación ligada a N esperada para Fc que tiene un sitio de glicosilación ligada a N de consenso.

LC / MS de proteína de Fc-sortasa reducida, N-deglicosilada: El pico era agudo. El peso molecular era menos de 2 daltones que el teórico, probablemente debido a la reducción de cisteína x2.

Exclusión por tamaño analítica en Superdex 200: Las proteínas de Fc-sortasa tienen entre 89 y 100% de dímero, 0 a 10% de tetrámero, y 0 a 1% de agregado.

SDS/PAGE de reducción: La proteína emigró predominantemente como un monómero del tamaño esperado.

Paso 2: Preparación de péptido de Apelina (H_2N-GGGGGQRPC*LSC*KGP (D-Nle)Fenetilamina) (SEQ ID NO: 70) para conjugación de Sortasa



(SEQ ID NOS 75, 70 y 70 respectivamente, en orden de aparición)

Paso 2a: Preparación de **Intermediario 43a**

Resina de fenetilamina-AMEBA (Sigma Aldrich, 0,25 g, 0,25 mmoles, 1,0 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático

(CEM LIBERTY) con Arg doble estándar para residuos de Arg. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF.

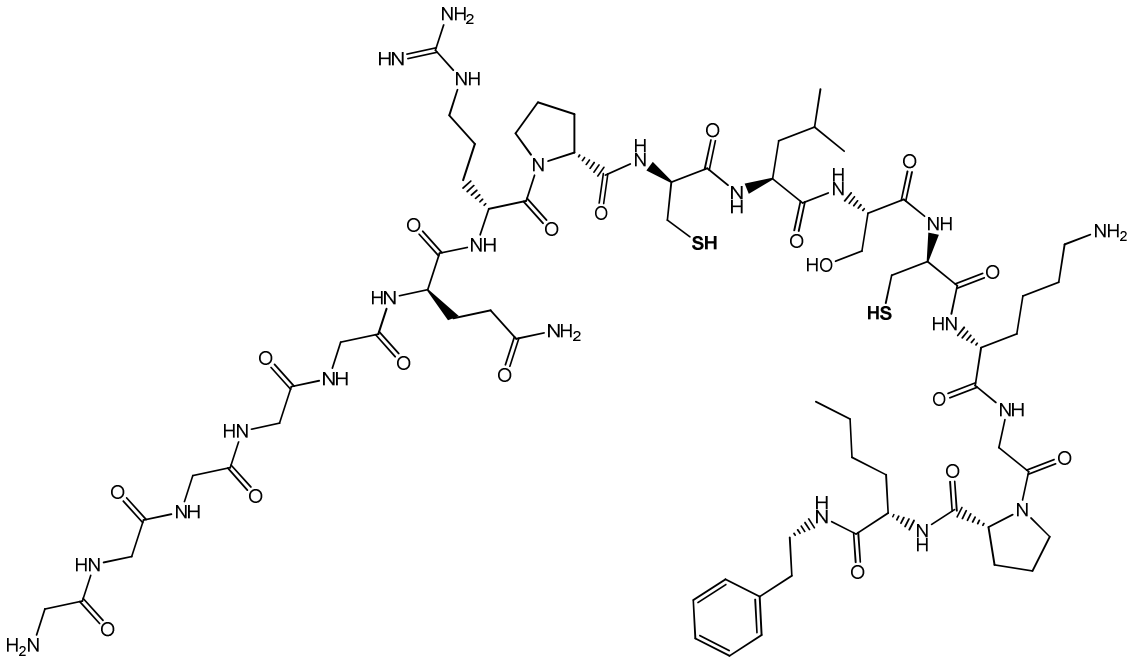
Un ciclo de acoplamiento se define como sigue:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (4,0 eq.), HATU (4,0 eq.), DIEA (25 eq.)
- Lavado: DMF (3 x 10 mL, 1 min cada vez).
- Desprotección Fmoc: Piperidina/DMF (1:4) (10 mL, 75 ° C durante 1 min luego 10 mL, 75 ° C durante 3 min).
- Lavado: DMF (4 x 10 mL, 1 min cada vez).

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Reacción Temperatura
1	Fmoc-D-Nle-OH	1x 5 min	75 ° C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 ° C
3	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 min	75 ° C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min a 25 ^{0}C 4 min a 50 ^{0}C
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 5 min	75 ° C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min	75 ° C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min a 25 ^{0}C 4 min a 50 ^{0}C
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 30 min	25 min a 25 ^{0}C 5 min a 75 ^{0}C
11	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 5 min	75 ° C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
13	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C
14	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ° C

Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (3 x 10 ml), DCM (3 x 10 ml). La resina peptídica se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el **Intermediario 43a** (0,622 g, 0,25 mmol).

Paso 2b: Preparación del Intermediario 42b, H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (SEQ ID NO: 70)



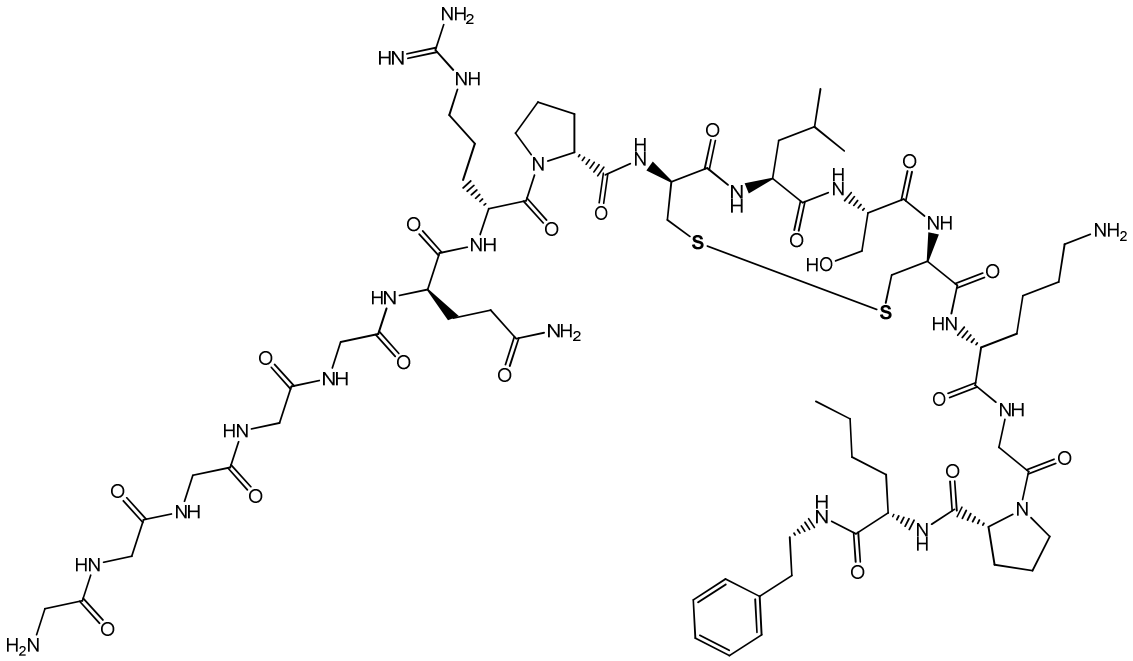
1) Escisión y eliminación del grupo protector

Al **intermedio43a** (0,622 g, 0,25 mmol) se añadió 3 ml de solución de 95% TFA/2.5% H_2O/TIPS al 2.5% y DTT (771 mg, 5,00 mmol), la mezcla resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 3 horas, luego se filtró. El filtrado se dejó caer en 40 ml de éter frío, después se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido blanco se lavó con éter (3 x 40 ml), se agitó en vórtex y se centrifugó. El sólido se secó a alto vacío a 25 ° C durante 1 hora.

2) Purificación

A continuación, el sólido de color blanco anterior se purificó por HPLC preparativa (columna Sunfire$_{TM}$ Prep C18 OBD^{TM} 30x50mm 5 um de ACN/H2O W /TFA al 0,1% 75ml/min, ACN al 10-30% 8 min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar el **Intermediario 43b** como sal de TFA (44 mg, 11%).

Paso 3: Preparación de H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetil)* (C^9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70), **Intermediario 43c**



A **Intermediario 43b** (44 mg, 0,028 mmol) en 0,9 ml de H_2O se añadió I_2 (50 mM en AcOH, 1,1 ml 0,055 mmoles) por goteo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. LC / MS mostró la reacción completada. A la mezcla de reacción se le añadió varias gotas de 0,5 M de solución de ácido ascórbico (MeOH/H_2O = 1/1) hasta que el color de la solución se desapareció. La mezcla se diluyó con MeOH para purificación por HPLC. El sólido de color blanco anterior se purificó por HPLC preparativa (columna Sunfire$_{TM}$ Prep C18 OBD^{TM} 30x50mm 5 um de ACN/H_2O W /TFA al 0,1% 75ml/min, ACN al 10-30% 8

min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (C^9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70), **Intermediario 43c** como sal de TFA (13 mg, 30%). LC/MS (QT2, ProductAnalysis-HRMS-Acidic, Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50 ° C, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 5,15 min): Tiempo de retención: 0,98 min; MS $[M+2]_{2+}$: observado: 1587.7993, calculado: 1587,868.

Paso 3: Conjugación de sortasa de Fc-Sortasa e Intermediario 43c

1) Conjugación de Sortasa Quimioenzimática

En baño de hielo, a la Fc-sortase (698 l, 0,040 mol, 3,15 mg / ml) en solución de búfer de PBS (pH 7,4) se añadió la solución de H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Fenetil) (C_9-C^{12} disulfuro) (SEQ ID NO: 70) (64,1 µl, 2,018 µmol, 50 mg / ml) en búfer de Tris-8.0, seguido de 520 µM de sortasa A (78 µl, 0,040 µmol) en 50 mM de Tris-Cl, pH 7,4, NaCl a 150 mM. La mezcla se sacudió a temperatura ambiente durante la noche. LC / MS mostró que la reacción se completó.

2) Purificación y desalinazión

La solución anterior se hizo fluir a través de una columna HiTrap Mab Select SuRe de 5 ml (GE Lifesciences # 11-0034-95) en 4mL/min en ATTA XPRESS. Ejemplo 43 se lavó en la columna con 20 volúmenes de columna (CV) PBS + Triton 114 al 0,1% y se eluyó con glicina a 0,1 M, pH 2,7, se neutralizó con tris-HCl a 1 M, pH 9 y se dializó frente a PBS. La solución purificada se desaló usando una columna de desalinización Zeba Sping, 5 ml (89891) para proporcionar 1,5 ml de solución objetivo, la concentración media fue de 0,598 mg / ml, y la recuperación fue de 90%. LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, AcQuity ProSwift RP-3U 4.6 x 50 mm, 1.0 mL/min, Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0.1%; Eluyente B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico al 0,1%, gradiente de 2% a 98% de B / A durante 3 min): R_t = 1.55 minutos, MS [M+H] 58845.0000.

Secuencia del Ejemplo 43:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT

51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 76)

en donde LSLSPGK*GGG GSLPETGGGGG* (SEQ ID NO: 77) representa el enlazador y *QRPC*LSC*KGP(D-Nle)Fenetilamina* (SEQ ID NO: 78) *el polipéptido.*

Se ha encontrado que el polipéptido en los ejemplos a continuación tienen valores EC_{50} en el rango de 0.01 nM a 1100 nM aproximadamente para potencia del receptor APJ. Se ha encontrado que los polipéptidos en los ejemplos a continuación tienen una estabilidad de plasma mayor de 2 minutos, mayor de 5 minutos, mayor de 10 minutos, mayor de 20 minutos, mayor de 50 minutos y mayor de 60 minutos.

Se puede ver que los polipéptidos de la invención son útiles como agonistas del receptor APJ y por lo tanto son útiles en el tratamiento de enfermedades y condiciones sensibles a la activación del receptor APJ, tal como las enfermedades divulgadas en la presente.

Además, la vida media de estos péptidos se puede ampliar aún más mediante la formación de un bioconjugado que comprende un péptido o polipéptido según una cualquiera de la Fórmula I a IV con un fracción de extensión de vida media, tales como albúmina de suero humano o un dominio Fc.

Habiendo descrito así las realizaciones de ejemplo de la presente invención, se debe notar por los expertos en la técnica, que las divulgaciones son de ejemplo solamente y que varias otras alternativas, adaptaciones, y modificaciones pueden realizarse dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a realizaciones específicas como se ilustra en la presente.

REIVINDICACIONES:

1. Un polipéptido cíclico que tiene la siguiente fórmula I (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está, bien sea ausente, Q, A o PE o X1 se selecciona entre C, c, hC, D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X3 es P o X3 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

X4 es R o X4 se selecciona entre C, c, hC y D-hC; en el que la cadena lateral de C, c, hC o D-hC forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X7;

en el que sólo uno de X1, X3 y X4 es un aminoácido que contiene azufre seleccionado de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de cualquiera de X1, X3 o X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o P, f , a, D-Nva o D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me) F, F, f, a, y, y Nal; en donde:

Nle es L-norleucina;

D-Nle es D-norleucina;

D-hC es D-homocisteina

hC es L-homocisteina;

Nal es L-nafatalina;

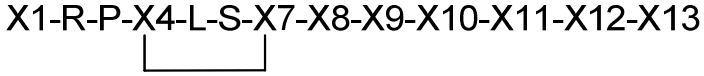
D-Nva es D-norvalina;

D-Abu es ácido D-2-aminobutírico;

pE es ácido L-piroglutámico;

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

2. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula II (SEQ ID NO: 2):



II

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido, y está ausente o se selecciona a partir de Q, A y pE;

X4 es C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X4;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

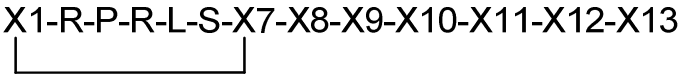
X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle, Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre F, (N-Me)F, f, a, y, y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

3. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



III

en donde

X1 es el extremo N del polipéptido y se selecciona a partir de C, c, hC y D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de X7 forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de X1;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

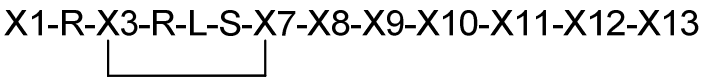
X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;

X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de (N-Me)F, F, f, a, y, y Nal;

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

4. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene la fórmula IV (SEQ ID NO: 5):



IV

en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y, es bien sea, ausente, Q, A o pE;

X3 es C, c, hC o D-hC; en donde la cadena lateral de C, c, hC o D-hC;

X7 es C, c, hC o D-hC; y la cadena lateral de X7 forman un enlace de disulfuro con la cadena lateral de C, c, hC o D-hC de X3;

X8 es K o F;

X9 es G, A, a o ausente;

X10 es P o ausente;

X11 es D-Nle , Nle, M o f; y

X12 es ausente o se selecciona de P, f , a, D-Nva y D-Abu ;
X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona entre (N-Me)F, F, f, a, y, y Nal; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 en donde X1 es pE; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

6. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 en donde X1 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido.

7. El polipéptido según las reivindicaciones 1 a 4 y 6 en donde el extremo N es una amida; o una sal del polipéptido.

8. El polipéptido según la reivindicación 7 en donde el extremo N es una amida de la Fórmula –NHR y R es acetilo, benzoilo, fenacilo, succinilo, octanoilo, 4-fenilbutanoilo, 4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$C(O)-, o Ph-CH_2CH_2NHC(O)-; o una sal del polipéptido.

9. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde X13 es F o f; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

10. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde X13 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido

11. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a-10 en donde X12 está ausente; o es una amida, un éster o una sal del polipéptido

12. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el extremo C es una amida; o una sal del polipéptido.

13. El polipéptido según la reivindicación 12 en donde el extremo 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.

14. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en donde X8 es K; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

15. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en donde X9 es G; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

16. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en donde X10 es P; o una amida, un éster o una sal del polipéptido

17. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en donde X11 es Nle o D-Nle; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

18. El polipéptido según la reivindicación 1 seleccionado a partir de (SEQ ID NOS 19-57, respectvamente, en orden de aparición):

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(fenetilo)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Fenetilo)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH_2
*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Fenetilo)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

en donde los dos aminoácidos rotulados con "*" representan los aminoácidos que forman un disulfuro; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

19. Un bioconjugado o multímero del mismo que comprende:

a. un péptido o polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o una amida, un éster o una sal del mismo, y

b. una fracción de extensión de vida media;

en donde dicho péptido o polipéptido y fracción de extensión de vida media se unen covalentemente o se fusionan, opcionalmente a través de un enlazador.

20. El bioconjugado o un mutimero del mismo, de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio constante de IgG o fragmento del mismo o una albúmina de suero humano.

21. El bioconjugado según las reivindicaciones 19 o 20 en donde la fracción de extensión de vida media es un fragmento Fc FcLALA-modificado con una mutación LALA (L234A, L235A).

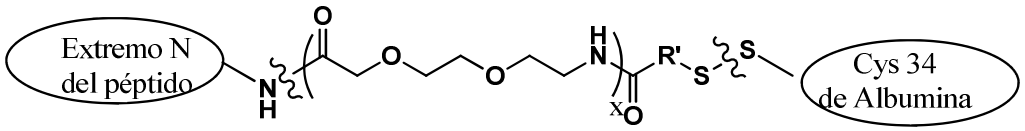
22. El bioconjugado de acuerdo con la reivindicación 21 en donde la fraccion de extensión de vida media es un dominio Fc que se fusiona a un polipéptido de la Fórmula I, II, III o IV a través de un enlazador y en donde el enlazador tiene la siguiente fórmula:
- [GGGGS]n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 7) o el enlazador es GS o GG, y el polipéptido de la fórmula I, II, III o IV contiene aminoácidos de origen natural.

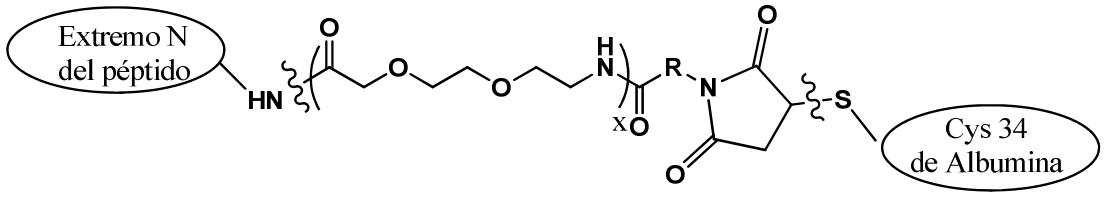
23. El bioconjugado según la reivindicación 22 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I que se selecciona entre QRPC*LSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 8), C*RPRLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 9) y QRC*RLSC*KGPMPF (SEQ ID NO: 10), en donde los dos aminoácidos marcados con "*" representan los aminoácidos que forman un disulfuro o enlace de amida a través de su cadena lateral.

24. El bioconjugado según la reivindicación 22 o 23 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina.

25. El bioconjugado o multímero del mismo de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 en el que la fracción de extensión de vida media es albúmina sérica humana.

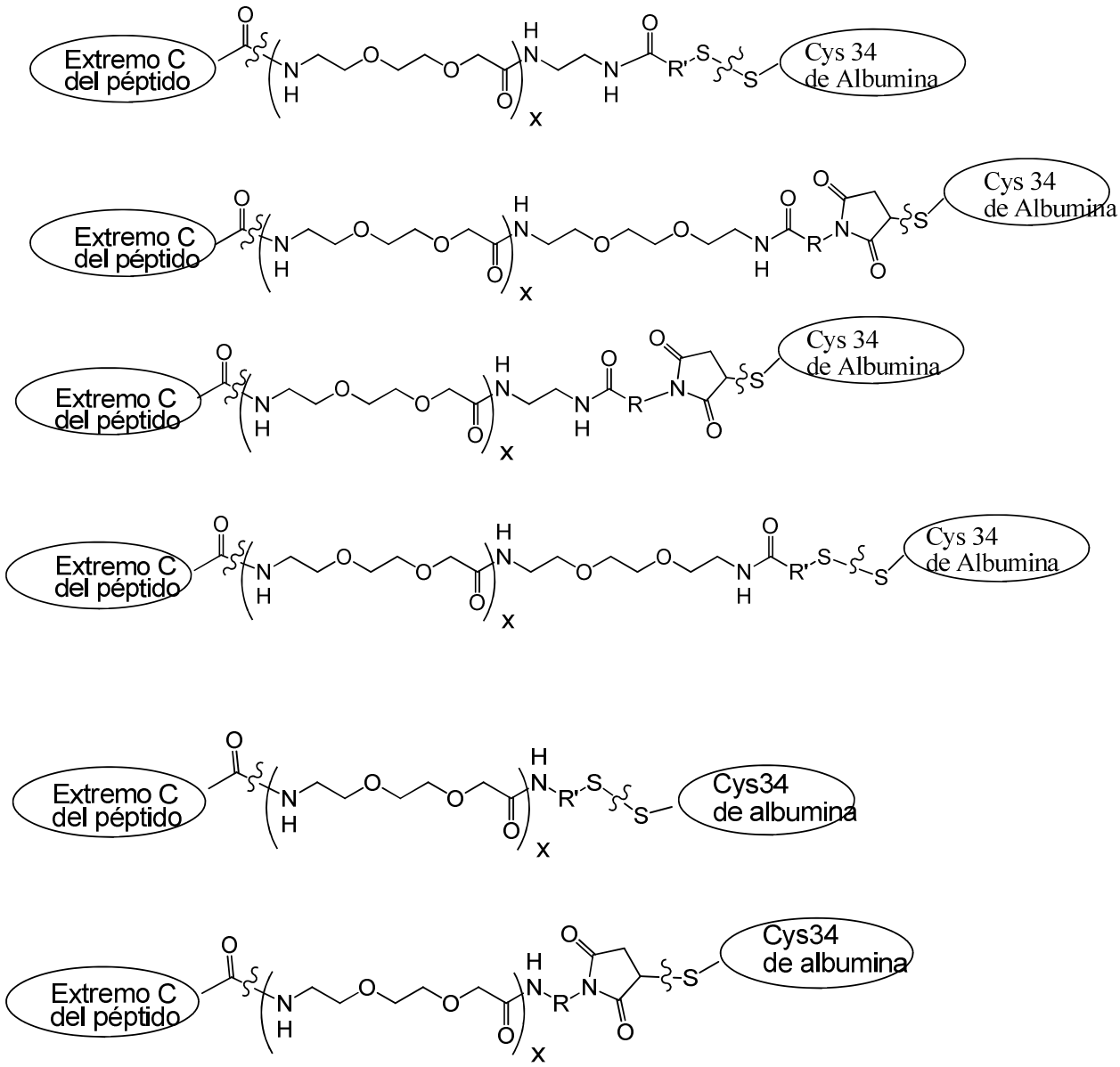
26. El bioconjugado según la reivindicación 25 en donde la albúmina sérica humana está químicamente ligada al extremo N-terminal de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:





en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

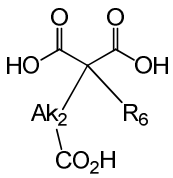
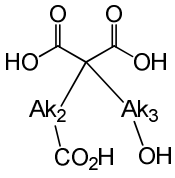
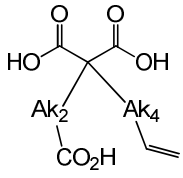
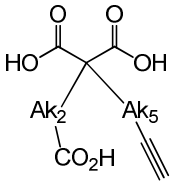
27. El bioconjugado según la reivindicación 19 o 20 en donde la albúmina sérica humana está químicamente ligada al extremo C-terminal de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a IV a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:

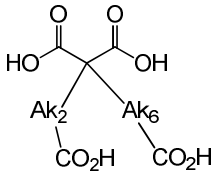
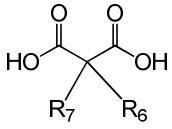
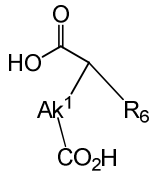


en donde x es 1-20, R es alquileno lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileno lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o combinación de los mismos.

28. El bioconjugado según la reivindicación 19 en donde la fracción de extensión de vida media es un ácido graso.

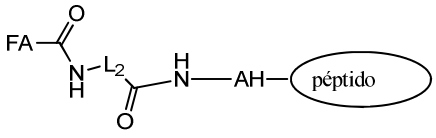
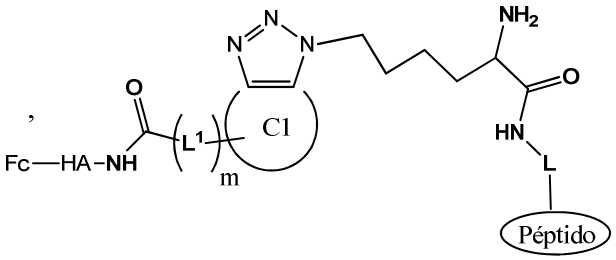
29. El bioconjugado según la reivindicación 28 en donde el ácido graso se selecciona de:

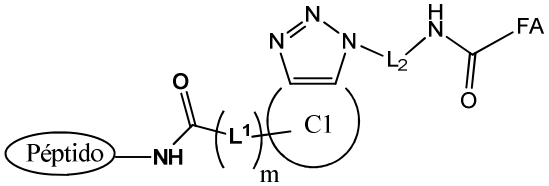







y


en donde Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 y Ak^6 son independientemente un (C_{8-20})alquileno, R^6 y R^7 son independientemente alquilo(C_{8-20}).

30. El bioconjugado según la reivindicación 19, 28 o 29 que tiene la siguiente fórmula:



o


(SEQ ID NO: 11)

en donde el péptido es el extremo N-terminal del péptido, n es 1, 2 o 3, m es 0 o 1, A es alanina, H es histidina, L2 es un enlazador, C1 es un sistema de anillo mono, di-, o tricíclico carboxílico o heterocíclico opcionalmente sustituido por flúor y L^1 es un enlazador de alquileno C1-C20 en donde la cadena de alquileno es opcionalmente sustituida por oxo (= O), y en donde uno o mas carbonos se sustituye por O o NH.

31. Un método de tratar o prevenir una enfermedad o trastorno sensible al agonismo del receptor APJ, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

32. El método de la reivindicación 31 en donde la enfermedad o trastorno se selecciona a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

33. Un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para uso como un medicamento.

34. Un polipéptido o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno sensible al agonismo del receptor APJ.

35. Un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 o para utilizar en el tratamiento de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis

lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

36. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, y uno o más co-agentes terapéuticamente activos.

37. Una combinación según la reivindicación 36 en donde el co-agente se selecciona a partir de inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la HMG-Co-A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidota de angiotensina (ACE), bloqueadores de canales de calcio (CCB), agonistas de endotelina, inhibidores de la renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes antidiabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de aldosterona, bloqueadores de receptores de endotelina, inhibidores de la aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesitirida) y/o un inhibidor de NEP.

38. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, una amida, un éster de una sal del mismo, o un bioconjugado de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Resumen

La invención proporciona un polipéptido cíclico de la Fórmula I' (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en donde X1, X3, X4, X7, X8, X9, X10, X11, X12 y X13 se definen en la presente. Los polipéptidos son agonistas del receptor APJ. La invención también se refiere a un método para la fabricación de los polipéptidos de la invención o bioconjugados de los mismos, y sus usos terapéuticos tales como el tratamiento o la prevención de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (IDAC), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia. La presente invención además proporciona una combinación de agentes farmacológicamente activos y una composición farmacéutica.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 January 2015 (29.01.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/013168 A1

(51) **International Patent Classification**:
C07K 14/47 (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(21) **International Application Number**:
PCT/US2014/047377

(22) **International Filing Date**:
21 July 2014 (21.07.2014)

(25) **Filing Language**: English

(26) **Publication Language**: English

(30) **Priority Data**:
61/858,263 25 July 2013 (25.07.2013) US
62/015,854 23 June 2014 (23.06.2014) US

(71) **Applicant** *(for all designated States except US)*: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Novartis Ag, Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) **Inventors; and**
(71) **Applicants** *(for US only)*: **BRUCE, Alexandra Marshall** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **GROSCHE, Philipp** [DE/CH]; Novartis Pharma AG, Postfach, CH-4002 Basel (CH). **GUIMARAES, Carla** [PT/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **KANTER, Aaron** [US/US]; 20 Brastow Ave., Somerville, Massachusetts 02143 (US). **LOU, Changgang** [CN/US]; 3681 Fawn Cove Lane, Apt. 1, Portage, Michigan 49024 (US). **USERA, Aimee Richardson** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **YASOSHIMA, Kayo** [JP/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **YUAN, Jun** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 400 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **ZECRI, Frederic** [FR/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **ZHAO, Hongjuan** [US/US]; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

(74) **Common Representative**: **NOVARTIS AG**; NOVARTIS AG, Lichtstrasse 35, CH-4056 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*

[Continued on next page]

(54) **Title**: CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

(I)

(57) **Abstract**: The invention provides a cyclic polypeptide of Formula I': I or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof, wherein X1, X3, X4, 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 or bioconjugates thereof, and their 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 2015/013168 A1

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

CYCLIC POLYPEPTIDES 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*. The very short half life is a recognized major difficulty with the delivery of such therapeutic endogenous peptides due to rapid serum clearance and proteolytic degradation via the action of peptidases.

One way which has been currently used to overcome this disadvantage is to administer large dosage of therapeutic peptide of interest to the patient so that even if some therapeutic peptide is degraded, enough remains to be therapeutically effective. However, this method is unconfortable to patients. Since most therapeutic peptides cannot be administered orally, the therapeutic peptide would have to be either constantly infused, frequently infused by intravenous injection or administered frequently by the inconvenient route of subcutaneous injections. The need for frequent administration also results in many potential peptide therapeutics having an unacceptable high projected cost of treatment. The presence of large amounts of degraded peptide may also generate undesired side effects.

Discomfort in administration and high costs are two reasons why most therapeutic peptides with attractive bioactivity profiles may not be developed as drug candidates.

Therefore, one approach to prolong half-life of peptides is to modify the therapeutic peptides in such a way that their degradation is slowed down while still maintaining biological activity.

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. Additinonal approaches includes reducing the rate of clearance by conjugating the peptides to molecules that prevent their elimination through kidney.

There is thus a need for modified therapeutic peptides with increased half-life in order to provide longer duration of action in vivo, while maintaining low toxicity yet retaining the therapeutic advantages of the modified peptides.

SUMMARY OF THE INVENTION:

This invention is directed to overcoming the problem of peptide degradation in the body by modifying the therapeutic peptide or polypeptide of interest, i.e. APJ agonists.

The aim of the present invention is to provide novel peptides and polypeptides or bioconjugate thereof, 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, or bioconjugates thereof, 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, or bioconjugates thereof, 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, or bioconjugates thereof, 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, or bioconjugates thereof, 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, as well as any peptides or polypeptides specifically listed herein, and bioconjugates thereof, including but not limited to the experimental examples.

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

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is Q, A or pE or X1 is selected from C, c, hC, D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC form a disulfide bond with the side chain of X7;
X3 is P or X3 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
X4 is R or X4 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
wherein only one of X1, X3 and X4 is a sulfur contain amino-acid selected from C, c, hC and D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of either X1, X3 or X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , Nle, M or f; and
X12 is absent or P, f , a, D-Nva or D-Abu ;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; wherein:
Nle is L-norleucine;
D-Nle is D-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
Nal is L-naphathaline;
D-Nva is D-norvaline;
D-Abu is D-2-aminobutyric acid;
pE is L-pyroglutamic acid;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereof.

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. Alternatively, a D-amino acid can be represented with a D-letter in front of the abbreviation letter(s). i.e.,when prededed with "D," the amino acid is a D-amino acid.

Any of the above-listed amino acid residues of Formula I, or its related formulae described herein, e.g., Formulae I to IV, 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 invention further provides a bioconjugate or a multimer thereof, comprising:

a. a peptide or a polypeptide of anyone of Formulae I to IV,
b. a half-life extending moiety;

wherein said peptide or polypeptide and said half life are covalently linked or fused, optionally via a linker.

"Optionally via a linker" means that the peptide of polypeptide according to Formulae I-IV is covalently linked or fused to the half-life extending moiety directly (i.e. with no linker) or is covalently linked or fused to the half-life extending moiety via a linker.

The half-life extending moiety of the invention can be covalently fused, attached, linked or conjugated to a peptide or polypeptide analog. A half-life extending moiety can be, for example, a polymer, such as polyethylene glycol (PEG), a cholesterol group, a carbohydrate or oligosaccharide; a fatty acid or any natural or synthetic protein, polypeptide or peptide that binds to a salvage receptor. Preferably, the half-life extending moiety is covalently linked, optionally via a linker, to plasma protein (albumin and immunoglobulin) with long serum half-lives. In other embodiment, the half-life extending moiety is an albumin binding residue. An "Albumin binding residue" as used herein means a residue which binds non-covalently to human serum albumin. In one embodiment the albumin binding residue is a lipophilic residue. In another embodiment, the albumin binding residue is negatively charged at physiological pH. An albumin binding residue typically comprises a carboxylic acid which can be negatively charged. Examples of albumin binding residue includes fatty acids. In

other embodiment, the half-life extending moiety is an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or an albumin-binding polypeptides or residue such as for example a fatty acid. Preferably, the half-life extending moiety portion of the bioconjugate is a human serum albumin or an Fc region. Most preferably, the half-life extending moiety portion of the bioconjugate is an Fc region.

The half-life extending moiety is attached in such a way so as enhance, and/or not to interfere with, the biological function of the constituent portions of the bio-conjugates of the invention, e.g., the peptide or polypeptide of the invention (Formulae I-IV). In some embodiments, the polypeptide of the invention can be fused to a half-life extending moiety, optionally via a linker. The half-life extending moiety can be a protein such as an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides or residue (e.g. a fatty acid). Such proteins disclosed herein can also form multimers.

In some embodiments, the half-life extending moiety (e.g., HSA, Fc, fatty acid etc.) is covalently linked or fused to the N-terminus of the peptide or polypeptide of any one of Formulae I-IV. In other embodiments, the half-life extending moiety (e.g., HSA, Fc, fatty acid etc.) is covalently linked or fused to C-terminus of the peptide or polypeptide of any one of Formulae I to IV of the invention.

The polypeptides of the invention, or bioconjugates thereof, via activation of the 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, or bioconjugates thereof, 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 any one of Formulae I to IV, or an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate 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 any one of Formulae I to IV, or an amide, an ester or salt thereof, or a bioconjugate thereof, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

In still another embodiment, the invention pertains to combinations including, a polypeptide according to any one of Formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 any one of Formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate 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, 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 any one of Formulae I-IV bound to an antibody, such as an antibody which 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.

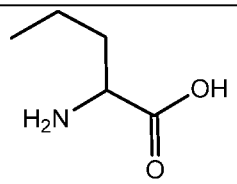
In addition, it is understood that such "unnatural amino acids" require a modified tRNA and a modified tRNA synthetase (RS) for incorporation into a protein. These "selected" orthogonal tRNA/RS pairs are generated by a selection process as developed by Schultz et al. or by random or targeted mutation. 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.

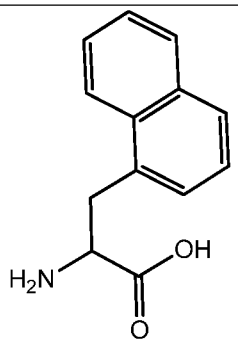
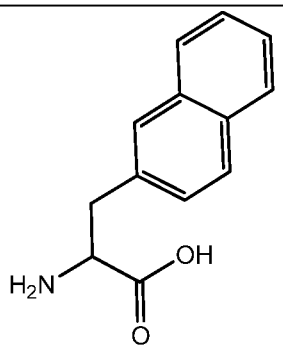
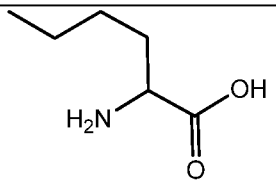
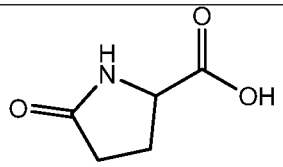
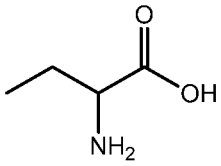
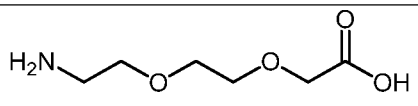
Modified encoded amino acids include, but are not limited to, hydroxyproline, γ-carboxyglutamate, O-phosphoserine, azetidinecarboxylic acid, 2-aminoadipic acid, 3-

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, naphthylalanine, 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
Nva or nva (D-Nva)	L-Norvaline or D-Norvaline	

1-Nal	1-Naphthylalanine	
2-Nal	2-Naphthylalanine	
Nle or nle (D-Nle)	L-Norleucine or D-Norleucine	
pE	Pyroglutamic acid	
Abu or abu (D-Abu)	2-amino-butyric acid	
O2Oc	8-Amino-3,6-dioxaoctanoic acid	

Nal refers to both 1-Naphthylalanine and 2-Naphthylalanine, preferably 2-naphthylalanine.

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-C_{1-2}alkylphenyl , -C(O)NH-NHBn, -C(O)-4 phenoxypiperidine or -C(O)N(C_{1-6} alkyl)$_2$).

The term “amide” also refers to derivatives 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 integer 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 alkyl refers to a fully saturated branched or unbranched (or straight chain or linear) hydrocarbon moiety, comprising 1 to 20 carbon atoms. Preferably the alkyl comprises 1 to 7 carbon atoms, and more preferably 1 to 4 carbon atoms.

The term aryl refers to monocyclic or bicyclic aromatic hydrocarbon groups having 6-10 carbon atoms in the ring portion. Representative examples of aryl are phenyl or naphthyl.

The term heteroaryl includes monocyclic or bicyclic heteroaryl, containing from 5-10 ring members selected from carbon atoms and 1 to 5 heteroatoms, and each heteroatoms is indepdendently selected from O, N or S wherein S and N may be oxidized to various oxidation states. For bicyclic heteroaryl system, the system is fully aromatic (i.e. all rings are aromatic).

The term cycloalkyl refers to saturated or unsaturated but non-aromatic monocyclic, bicyclic or tricyclic hydrocarbon groups of 3-12 carbon atoms, preferably 3-8, or 3-7 carbon atoms. For bicyclic, and tricyclic cycloalkyl system, all rings are non-aromatic.

The term heterocyclyl refers to a saturated or unsaturated non-aromatic (partially unsaturated) ring which is a 4-, 5-, 6-, or 7-membered monocyclic, and contains at least one heteroatom selected from O, S and N, where the N and S can also optionally be oxidized to various oxidation states. In one embodiment, heterocyclyl moiety represents a saturated monocyclic ring containing from 5-7 ring atoms and optionally containing a further heteroatom, selected from O, S or N.

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.

The term "conjugate" and "bioconjuagte" is used interchangealbly and is intended to refer to the entity formed as a result of a covalent attachment bewteen a polypeptide of anyone of Formulae I to IV, and a half-life extending moiety, optionally via linker. The term "Conjugate" or "bioconjugate" is also intended to include an entity formed as a result of a

fusion between an APJ agonist polyppetide or a polypeptide of Formula I, II, III or IV, and a half life extending moiety.

The term half-life extending moiety can be covalently linked/attached or fused to a peptide or polypeptide analog. A half-life extending moiety can be, for example, a polymer, such as polyethylene glycol (PEG), fatty acid, a cholesterol group, a carbohydrate or olisaccharide; or any natural or synthetic protein, polypeptide or peptide that binds to a salvage receptor. In other embodiment, the half-life extending moiety is an albumin binding residue. An “Albumin binding residue" as used herein means a residue which binds non-covalently to human serum albumin. In one embodiment the albumin binding residue is a lipophilic residue. In another embodiment, the albumin binding residue is negatively charged at physiological pH. An albumin binding residue typically comprises a carboxylic acid which can be negatively charged. Examples of albumin binding residue includes fatty acids. In other embodiment, the half-life extending moiety is covalently linked, optionally via a linker, to plasma protein (albumin and immunoglobulin) with long serum half-lives. For example, the half-life extending moiety is an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or an albumin-binding polypeptides or residue (e.g a fatty acid). Most preferably, the half-life extending moiety portion of the bioconjugate is an Fc region.

The term “increased half-life” or “increase serum half-life” or “extending half-life” is meant the positive change in circulating half-life of a modified biologically active molecule (e.g. apelin 13) relative to its non-modified form (or naked form of the peptide). Serum half-life is measured by taking blood samples at various time points after administration of the biologically active molecule, and determining the concentration of that molecule in each sample. Measuring the change in serum concentration with time allows calculation of the serum half-life of a modified molecule (e.g. conjugated molecule). By comparing the serum half-life of a modified molecule (e.g. conjugated molecule), with an unmodified molecule (e.g. apelin 13), the relative increase in serum half-life or t1/2 may be determined. The increase is desirably at least about two-fold, but a smaller increase may be useful.

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-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

wherein:

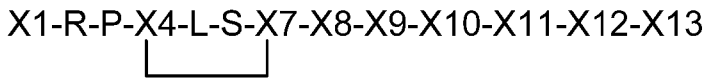
X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent, Q, A or pE or X1 is selected from C, c, hC, D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC form a disulfide bond with the side chain of X7;
X3 is P or X3 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
X4 is R or X4 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
wherein only one of X1, X3 and X4 is a sulfur contain amino-acid selected from C, c, hC and D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of either X1, X3 or X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A or a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , Nle, M or f; and
X12 is absent or P, f , a, D-Nva or D-Abu;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; wherein:
Nle is L-norleucine;
D-Nle is D-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
Nal is L-naphathaline;
D-Nva is D-norvaline;
D-Abu is D-2-aminobutyric acid;
pE is L-pyroglutamic acid;

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 of formula (II):



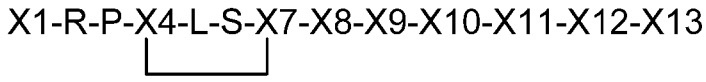
II

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent, Q, A or pE;
X4 is C, c, hC or D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , M, Nle or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, (N-Me)F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide, or a polypeptide substantially equivalent thereto.

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



II

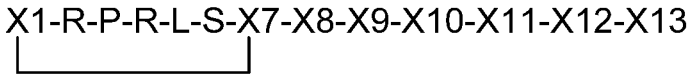
wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or pE;
X4 is C, c, hC or D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , Nle or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, (N-Me)F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide, or a polypeptide substantially equivalent thereto.

In embodiment 3, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide of formula III:



III

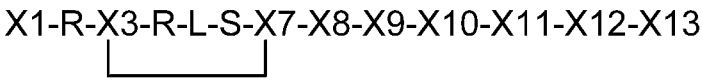
wherein

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is selected from C, c, hC and D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; wherein the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of X1;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle, Nle, M or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 3A, the invention pertains to polypeptides of Formula III wherein X11 is D-Nle, Nle or f, or an amide, an ester or a salt thereof.

In embodiment 4, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide of Formula IV:



IV

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent, Q, A or pE;

X3 is C, c, hC or D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC;

X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 form a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of X3;

X8 is K or F;

X9 is G, A, a or absent;

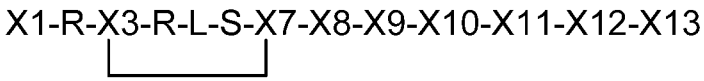
X10 is P or absent;

X11 is D-Nle, Nle, M or f; and

X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 4A, the invention therefore provides a peptide or a polypeptide of Formula IV:



IV

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or pE;

X3 is C, c, hC or D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC;

X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 form a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of X3;

X8 is K or F;

X9 is G, A, a or absent;

X10 is P or absent;

X11 is D-Nle, Nle or f; and

X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 5, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1, 2 and 4 wherein X1 is pE; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 5A, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embpdiments 1, 2, and 4 wherein X1 is A or Q; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide. In a particular aspect of this embodiment, the peptide is chemically linked or fused to a half-life extending moiety via it's A or Q N-terminus.

In embodiment 6, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1, 2, 4 and 4A wherein X1 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 7, the invention pertains to a polypeptide according to any one embodiments 1 to 4 and 6 wherein the N-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

In embodiment 8, the invention pertains to a polypeptide according to embodiment 7 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.

In embodiment 8A, the invention pertains to a polypeptide of any one of embodiments 1 to 4 and 7 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.Examples of N-terminus amides have been described in US provisional application No. 61/591,557 (Attorney Docket Number PAT054961-US-PSP) filed on January 27, 2012, which is hereby incorporated by reference.

In embodiment 9, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1 to 8A wherein X13 is F or f; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 10, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1 to 8A wherein X13 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 11, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1-10 wherein X12 is absent; or an amide, and ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 12, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1 to 11 wherein the C-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

In embodiment 13, the invention pertains to a polypeptide according to embodiment 12 wherein the C-terminus is an amide of Formula –C(O)-R2 and R2 is -NH_2, -NH-Me, -NH-NHBn, -N(CH_3)-(CH_2)$_2$-Ph or -NH-(CH_2)$_2$-Ph; or a salt of the polypeptide.

In embodiment 14, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1-13 wherein X8 is K; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 15, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1 to 14 wherein X9 is G; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 16, the invention pertains to a polypeptide according to any one of embodiments 1 to 15 wherein X10 is P; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.
19.

In embodiment 17, the invention pertains to a polypeptide according to any one of claims 1 to 16 wherein X11 is Nle or D-Nle; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

In embodiment 17A, the invention pertains to a polypeptide according to anyone of embodiments 1 to 17, wherein the C-terminus consisting of the X11-X12-X13 moiety is selected from Nle-P-phenethylamine, Nle-P-(N-Me)F, Nle-P-NH2, Nle-Phenethylamine, (D-Nle)-phenethylamine, Nle-P-f, D-Nle-a-f, (D-Nle)-NH2, (D-Nle)-f, (D-Nle)-a-d, (D-Nle)-a-y,

(D-Nle)-(D-Nva)-f, Nle-P-F, Nle-P-a, Nle-P-Nal and (D-Nle)-(D-Abu)-f, or a salt of the polypeptide. In one particular aspect of this embodiment, the invention relates to a polypeptide according to embodiment 17A wherein the C-terminus consisting of the X11-X12-X13 moiety is selected from (D-Nle)-phenethylamine, (D-Nle)-a-f and f-a-f, or a salt of the polypeptide.

In one embodiment 17B, the invention pertains to a peptide or polypeptide of anyone of embodiments 1 to 17, wherein at last two of the amino acids X1, X3, X4 and X7 to X13 are different from the corresponding amino acids present in Pyr-1-apelin-13. In another embodiment, the invention pertains to a peptide or polypeptide of anyone of embodiments 1 to 18 wherein at least three of the amino acids X1, X3, X4 and X7 to X13 are different from the corresponding amino acids present in Pyr-1-apelin-13. In yet another embodiment, the invention pertains to a peptide or polypeptide of anyone of embodiments 1 to 18 wherein at least four of the amino acids X1, X3, X4 and X7 to X13 are different from the corresponding amino acids present in Pyr-1-apelin-13.

In another embodiment, X1, X3, X4 and X7-X13 amino acids are those defined by X1, X3, X4, and X7-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 II, III or IV); 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 II, III or IV); 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, II, III or IV, 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, or at least 80 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 or polypeptide of formulae I, II, III or IV is maintained and the plasma stability is improved over the pyroglutamated form of apelin-13.

In embodiment 19, the invention further pertains to a bioconjugate or a multimer thereof, comprising:

a. a peptide or polypeptide of Formulae I, II, III or IV, an amide, salt or ester thereof, according to anyone of the preceding embodiments;
b. a half-life extending moiety;

wherein said peptide or polypeptide and said half-life extending moiety are covalently linked or fused, optionally via a linker.

In embodiment 19A, the half-life extending moiety is attached to the N-terminus of the peptide of Formula I, II, III or IV, optionally via a linker moiety.

In embodiment 19B, the half-life extending moiety is covalently linked or fused to the C-terminus of the peptide of Formula I, II, III or IV, optionally via a linker moiety.

In embodiment 19C, the half-life extending moiety is covalently linked or fused to a side chain of the peptide of Formula I, II, III or IV, e.g. the half-life is covalently linked or fused to an amino group in the side chain of K, Orn, Dab, Dap, hK or 4-amino-Isn, optionally via a linker moiety. Preferably, the half-life extending moiety is attached to the N-terminus of the peptide of Formula I, II, III or IV, optionally via a linker moiety.

In embodiment 20, the invention pertains to the bioconjugate or a mutimer thereof, according to embodiment 19, wherein the half-life extending moiety is an IgG constant domain or fragment thereof, a fatty acid or a human Serum Albumin.

In embodiment 21, the invention pertains to a bioconjugate according to embodiments 19 or 20 wherein the half-life extending moiety is a FcLALA modified Fc fragment with a LALA mutation (L234A, L235A).

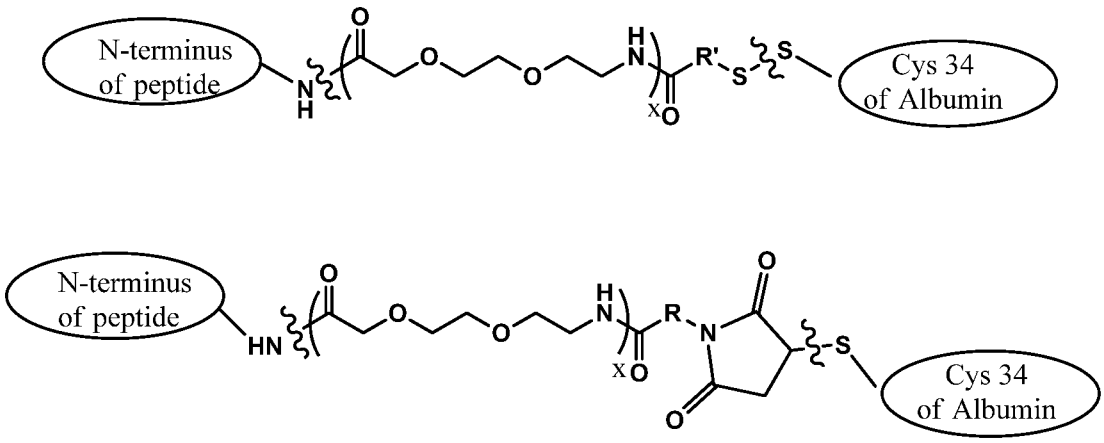
In embodiment 22, the invention pertains to the bioconjugate according to embodiment 21 wherein the half-life extending moiety is a Fc domain which is fused or covalently linked to a polypeptide of Formula I, II, III or IV via a linker and wherein the linker has the following Formula: -[GGGGS]n-, n is 1, 2 or 3 or the linker is GG or GS and the polypeptide of Formula I, II, III or IV contains naturally occurring amino acids.

In embodiment 23, the invention pertains to the bioconjugate according to embodiment 22 wherein the polypeptide is a polypeptide of Formula I is selected from QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF and QRC*RLSC*KGPMPF, wherein the two amino acids labeled with "*" represent the amino acids forming a disulfide or amide bond via their side chain.

In embodiment 23A, the invention pertains to a bioconjugate according embodiment 22 or 23 wherein the half-life extending moiety is a modified Fc domain wherein the C-terminal Lysine has been deleted or replaced with Alanine. Such Fc-variants have been described in co-filed application (US provisional application No. 62/015848: attorney docket number PAT055781-US-PSP02) and have generated more stable fusion proteins with Apelin peptide/polypeptides.

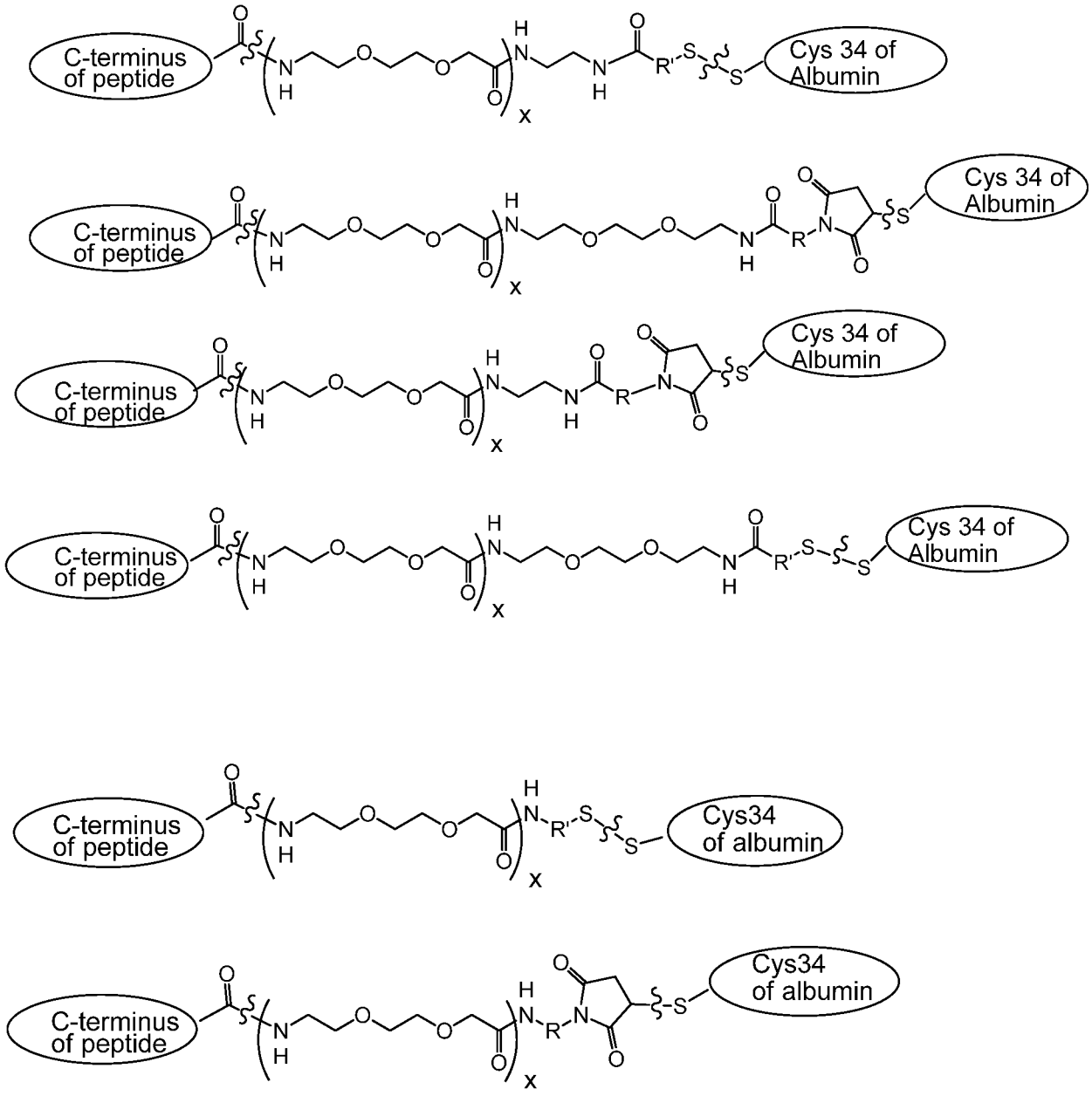
In embodiment 24, the invention pertains to the bioconjugate or multimer thereof according to embodiment 19 or 20 wherein the half-life extending moiety is Human Serum Albumin.

In embodiment 25, the invention pertains to the bioconjugate according to embodiment 24 wherein the Human Serum Albumin is chemically linked to the N-terminus of a polypeptide of any one of Formulae I to IV via a linker of the following Formulae:



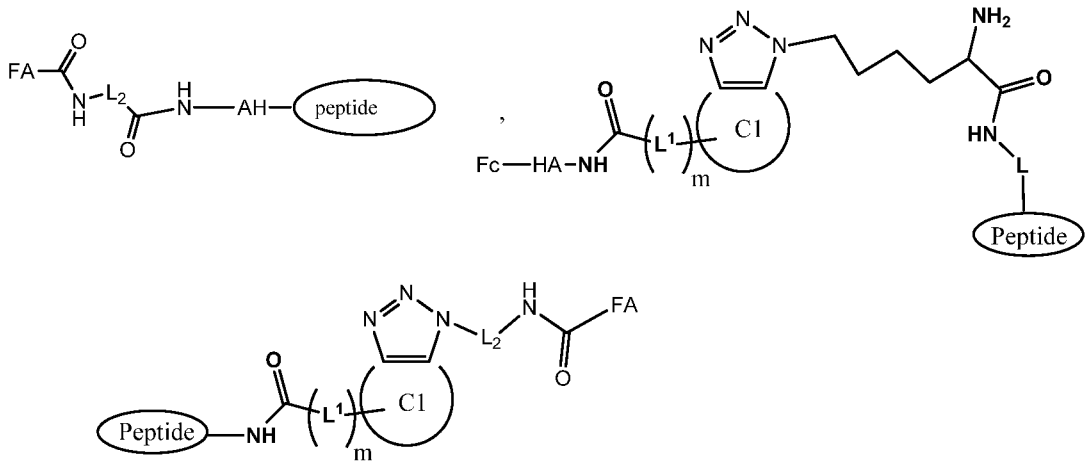
wherein x is 1- 20, R is linear or branched alkylene, cycloalkyl, aryl of heteroaryl or combination thereof, R' is linear or branched alkylene, aryl or cycloalkyl or combination thereof.

In embodiment 26, the invention pertains to the bioconjugate according to embodiment 19 or 20 wherein the Human Serum Albumin is chemically linked to the C-terminus of a polypeptide of any one of Formulae I to IV via a linker of the following Formulae:



wherein x is 1-20, R is linear or branched alkylene, cycloalkyl, aryl of heteroaryl or combination thereof, R' is linear or branched alkylene, aryl or cycloalkyl or combination thereof.

In other embodiment, the bioconjugate of the invention has the following formulae:



or



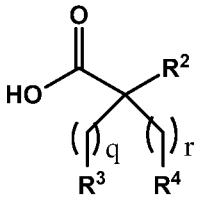
wherein peptide is the N-terminus of the peptide, A is alanine, H is histidine, n is 1, 2 or 3, m is 0 or 1, L and L2 are linkers, C1 is a mono, di or tricyclic carbocyclic or heterocyclic ring system optionally substituted with fluorine and L^1 is a C1-C20 alkylene linker wherein the alkylene chain is optionally substituted with oxo (=O), and wherein one or more carbon is replaced with O or NH. In a particular aspect of this embodiment, L and L2 are PEG linkers.

Half-Life extending moiety

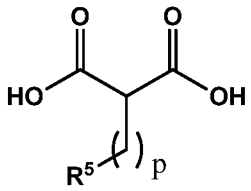
The half-life extending moiety of the invention can be covalently attached, linked, conjugated or fused to a peptide or polypeptide analog. A half-life extending moiety can be, for example, a polymer, such as polyethylene glycol (PEG), a fatty acid, a cholesterol group, a carbohydrate or olisaccharide; or any natural or synthetic protein, polypeptide or peptide that binds to a salvage receptor. Preferably, the half-life extending moiety is covalently linked, optionally via a linker, to plasma protein (albumin and immunoglobulin) with long serum half-lives. For example, the half-life extending moiety is an IgG constant domain or fragment thereof (e.g., the Fc region), Human Serum Albumin (HSA), or albumin-binding polypeptides or residue (e.g a fatty acid). Preferably, the half-life extending moiety portion of the bioconjugate is human serum albumin, a fatty acid or an Fc region.

Half-life extending moieties include Albumin, which refers to the most abundant protein in the blood plasma having a molecular weight of approximately between 65 and 67 kilodaltons in its monomeric form, depending on species of origin. The term “albumin” is used interchangeably with “serum albumin” and is not meant to define the source of albumin which forms a conjugate with the modified peptides of the invention. Thus, the term “albumin” as used herein may refer either to albumin purified from a natural source such as blood or serous fluis, or it may refer to chemicaly synthetisized or recombinantly produced albumin. Modified peptides or polypeptides of the invention are preferentially tethered to the free thiol group of the cysteine-34 on the surface of the albumin, optionally via a linker.

Half-life extending moieties include fatty acids, which can be defined as a C6-70alkyl, a C6-70alkenyl or a C6-70alkynyl chain, each of which is substituted with at least one carboxylic acid (for example 1, 2, 3 or 4 CO2H) and optionally further substituted with hydroxyl group. Examples of fatty acid are defined by Formulae A1, A2 and A3:

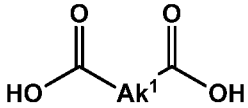


A1



A2

or



A3

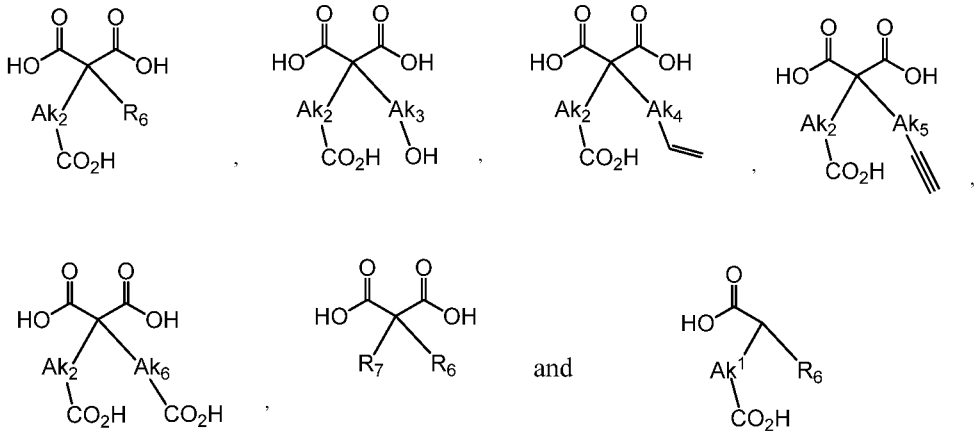
R^2 is CO_2H, H;

R^3, R^4 and R^5 are independently of each other H, OH, CO_2H, -CH=CH_2 or –C≡CH;

Ak^1 is a branched C_6-C_{30}alkylene;

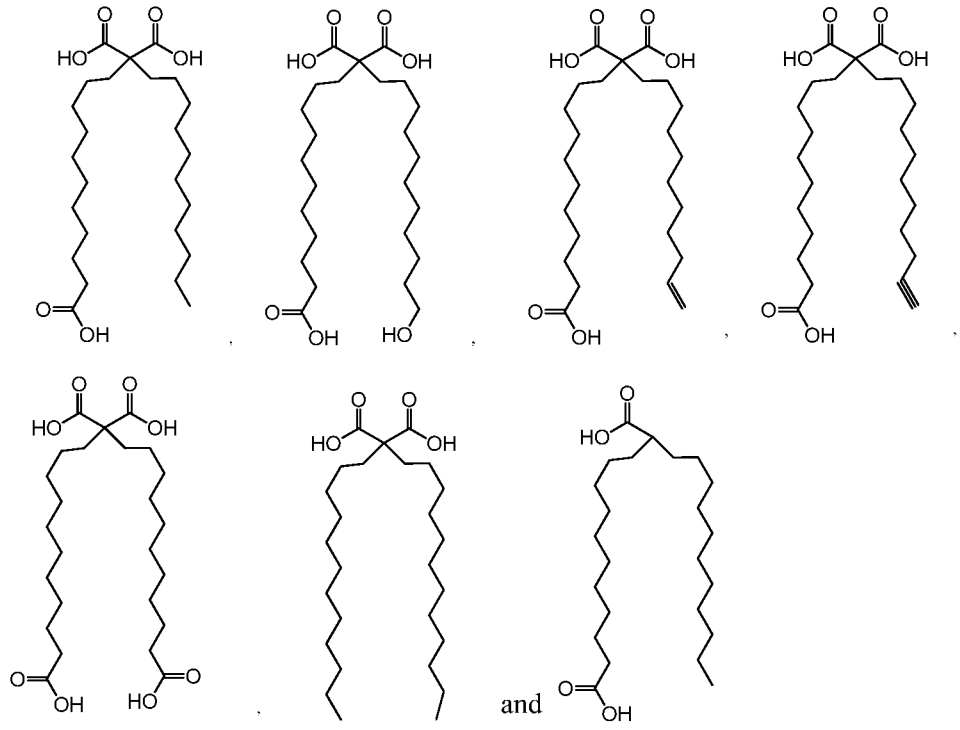
q, r and p are independently of each other an integer between 6 and 30; or an amide, an ester or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Examples of fatty acids are selected from:



wherein Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 and Ak^6 are independently a (C_{8-20})alkylene, R^6 and R^7 are independently (C_{8-20})alkyl.

More specifically, fatty acids are selected from:



These fatty acid moieties have been described in co-filed application, US provisional application No. 62/015862 attorney docket number PAT056274-US-PSP.

Half-life extending moieties include “native Fc” which refers to molecule or sequence comprising the sequence of a non-antigen-binding fragment resulting from digestion of whole antibody or produced by other means, whether in monomeric or multimeric form, and can contain the hinge region. The original immunoglobulin source of the native Fc is preferably of human origin and can be any of the immunoglobulins, although IgG1 and IgG2 are preferred. Native Fc molecules are made up of monomeric polypeptides that can be linked into dimeric or multimeric forms by covalent (i.e., disulfide bonds) and non-covalent association. The number of intermolecular disulfide bonds between monomeric subunits of native Fc molecules ranges from 1 to 4 depending on class (e.g., IgG, IgA, and IgE) or subclass (e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, and IgGA2). One example of a native Fc is a disulfide-bonded dimer resulting from papain digestion of an IgG (see Ellison et al., 1982, Nucleic Acids Res. 10: 4071-9). The term “native Fc” as used herein is generic to the monomeric, dimeric, and multimeric forms.

Half-life extending moieties include “Fc variant” which refers to a molecule or sequence that is modified from a native Fc but still comprises a binding site for the salvage receptor, FcRn (neonatal Fc receptor). International Publication Nos. WO 97/34631 and WO 96/32478 describe exemplary Fc variants, as well as interaction with the salvage receptor, and are hereby incorporated by reference. Thus, the term “Fc variant” can comprise a molecule or sequence that is humanized from a non-human native Fc. Furthermore, a native Fc comprises regions that can be removed because they provide structural features or biological activity that are not required for the bioconjugate of the invention. Thus, the term “Fc variant” comprises a molecule or sequence that lacks one or more native Fc sites or residues, or in which one or more Fc sites or residues has be modified, that affect or are involved in: (1) disulfide bond formation, (2) incompatibility with a selected host cell, (3) N-terminal heterogeneity upon expression in a selected host cell, (4) glycosylation, (5) interaction with complement, (6) binding to an Fc receptor other than a salvage receptor, or (7) antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Fc variants are described in further detail hereinafter.

Half-life extending moieties include Fc variant wherein the C-terminus lysine has been deleted or replaced with alanine.

Half-time extending moieties refer to “Fc domain” which encompasses native Fc and Fc variants and sequences as defined above. As with Fc variants and native Fc molecules, the term “Fc domain” includes molecules in monomeric or multimeric form, whether digested from whole antibody or produced by other means. In some embodiments of

the present invention, an Fc domain can be conjugated to a polypeptide of Formula I' or anyone of Formulae I-IV via, for example, a covalent bond between the Fc domain and the peptide sequence. Such Fc proteins can form multimers via the association of the Fc domains and both these Fc proteins and their multimers are an aspect of the present invention.

Half-life extending moieties include "modified Fc fragment", which shall mean an Fc fragment of an antibody comprising a modified sequence. The Fc fragment is a portion of an antibody comprising the CH2, CH3 and part of the hinge region. The modified Fc fragment can be derived from, for example, IgGl, IgG2, IgG3, or IgG4. FcLALA is a modified Fc fragment with a LALA mutation (L234A, L235A), which triggers ADCC with lowered efficiency, and binds and activates human complement weakly. Hessell et al. 2007 Nature 449:101-104. Additional modifications to the Fc fragment are described in, for example, U.S. Patent No. 7,217,798.

The term "multimer" as applied to Fc domains or molecule comprising Fc domains refers to molecules having two or more polypeptide chains associated covalently. For example IgG molecules typically form dimers and therefore a bioconjugate comprising a dimeric IgG molecule would be fused to two polypeptide chains of Formula I, IA, II, III or IV.

Linker

Any linker group is optional. When present, its chemical structure is not critical, since it serves primarily as a spacer.

The linker is a chemical moiety that contains two reactive groups/functional groups, one of which can react with the polypeptide and the other with the half-life extending moiety. The two reactive groups of the linker are linked via a linking group, structure of which is not critical as long as it does not interefere with the coupling of the linker to the peptide and the half-extending moiety.

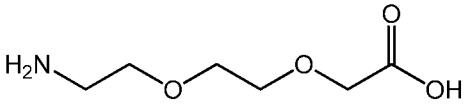
The linker can be made up of amino acids linked together by peptide bonds. In some embodiments of the present invention, the linker is made up of from 1 to 20 amino acids linked by peptide bonds, wherein the amino acids are selected from the 20 naturally occurring amino acids. In various embodiments, the 1 to 20 amino acids are selected from the amino acids glycine, serine, alanine, proline, asparagine, glutamine, cysteine and lysine. In some embodiments, a linker is made up of a majority of amino acids that are sterically unhindered, such as glycine and alanine. In some embodiments, linkers are polyglycines, polyalanines, combinations of glycine and alanine (such as poly(Gly-Ala)), or combinations of

glycine and serine (such as poly(Gly-Ser)). In some embodiments, a linker comprises a majority of amino acids selected from histidine, alanine, methionine, glutamine, asparagine and glycine. In some embodiments, linkers contain poly-histidine moiety. Examples of linkers are linkers which comprise the motif AH, MHA or AHA. Such motifs have been described in copending applications and co-filed applications, attorney docket numbers US provisional application No. 62/015862 : PAT056274-US-PSP and US provisional application No. 62/015868: PAT056275-US-PSP, to be beneficial for selective conjugation at the N-terminus of a peptide or polypeptide.

Other examples of linkers comprises the motif GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGS, GS or GG.

In some other embodiment, the linker comprises recognition motifs for enzyme. An example is the LPXTG/A motif which can be included at the C-terminus wherein X is any amino acid, most commonly an E: Glutamic acid. (L: leucine, P: proline, T: threonine, G: Glycine, A; Alanine). (Carla P. Guimaraes et al.: “Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions”, Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787-1799)

In other embodiments, the linker comprises 1 to 20 amino acids which are selected from unnatural amino acids. While a linker of 3-15 amino acid residues is preferred for conjugation with the half-life extending moiety, the present invention contemplates linkers of any length or composition. A preferred amino acid linker is O2Oc of the following formula:

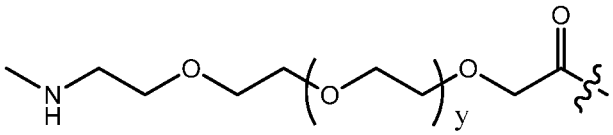


or its repeating units.

The linkers described herein are exemplary, and linkers that are much longer and which include other residues are contemplated by the present invention. Non-peptide linkers are also contemplated by the present invention.

The linking portion of the linker may comprise one or more alkyl groups, alkoxy groups, alkenyl groups, cycloalkyl groups, aryl groups, heteroaryl groups and heterocyclic groups or combination thereof. For example, alkyl linkers such as such as –NH-(CH_2)z-C(O)- or –S-(CH_2)z-C(O)- or –O-(CH_2)z-C(O)- wherein z is 2-20 can be used. These alkyl linkers can further be substituted by any non-sterically hindering group, including, but not limited to, a lower alkyl (e.g., C1-C6), lower acyl, halogen (e.g., Cl, Br), CN, NH2, or phenyl.

The linker can also be of polymeric nature. The linker may include polymer chains or units that are biostable or biodegradable. Polymers with repeat linkage may have varying degrees of stability under physiological conditions depending on bond lability. Polymers may contain bonds such as polycarbonates (-O-C(O)-O-), polyesters (-C(O)-O-), polyurethanes (-NH-C(O)-O-), polyamide (-C(O)-NH-). These bonds are provided by way of examples, and are not intended to limit the type of bonds employeable in the polymer chains or linkers of the invention. Suitable polymers include, for example, polyethylene glycol (PEG), polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol, polyamino acids, divinylether maleic anhydride, N-(2-hydroxypropyl)-methacrylicamide, dextran, dextran derivatives, polypropylene glycol, polyoxyethylated polyol, heparin, heparin fragments, polysaccharides, cellulose and cellulose derivatives, starch and starch derivatives, polyalkylene glycol and derivatives thereof, copolymers of polyalkylene glycols and derivatives thereof, polyvinyl ethyl ether, and the like and mixtures thereof. A polymer linker is for example PEG. An exemplary non-peptide linker is a polyethylene glycol linker:



wherein y is so that the linker has a molecular weight of 100 to 5000 kD, for example, 100 to 500 kD.

Preferably, the linking moiety contains one or more amino acid moieties such as for example (O2Oc) unit or or Glycine or serine, C_{1-4}alkylene-C(O)-, C_{1-4}alkylene, -NH-C_{2-6}alkylene-NH- or -NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH- diamino units or combination thereof and the linking moiety linked 2 reactive groups or functional groups.

Preferably, the reactive groups or functional groups are maleimide, thiol or pyridine-2-yldisulfanyl.

Preparation of peptide or polypeptide and peptide-linker construct for attachment to a half-life extending moiety:

The apelin peptides and polypetides and/or peptide-linker construct of the invention may be produced by either synthetic chemical processes or by recombinant methods or combination of both methods. The Apelin peptides and/or peptide-linker constructs may be

prepared as full-length or may be synthesized as non-full length fragments and joined. 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-methylbenz-hydrylamine 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 α-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.

Alternatively, recombinant expression methods are particularly useful. Recombinant protein expression using a host cell (a cell artificially engineered to comprise nucleic acids encoding the sequence of the peptide and which will transcribe and translate, and optionally, secrete the peptide into the cell growth medium) is used routinely in the art. For recombinant production process, a nucleic acid coding for amino acid sequence of the peptide would typically be synthesized by conventionaly methods and integrated into an expression vector. Such methods is particularly preferred for manufacture of the polypeptide compositions comprising the peptides fused to additional peptide sequences or other proteins or protein fragments or domains. The host cell can optionally be at least one selected from from E.Coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, heLa, myeloma, lymphoma, yeast, insect or plant cells, or any derivative, immortalized or transformed cell thereof.

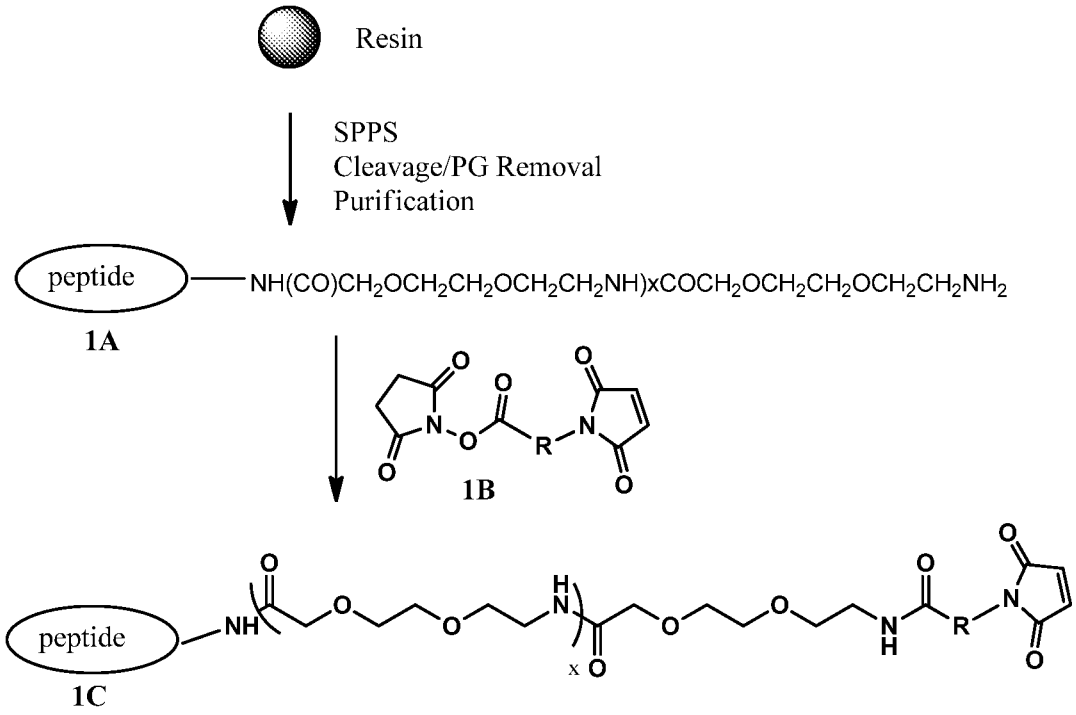
The modified therapeutic peptides or polypeptides and/or peptide-linker construct include reactive groups which can react with available reactive functionalities on the half-life extending moiety to form a covalent bond. Reactive groups are chemical groups capable of forming a covalent bond. Reactive groups can generally be carboxy, phosphoryl, acyl group, ester or mixed anhydride, maleimide, imidate, pyridine-2-yl-disulfanyl, thereby capable of forming a covalent bond with functionalities like amino group, hydroxyl group, carboxy group or a thiol group at the target site of the Albumin or Fc domain. Reactive groups of particular interest for linking to an Albumin include maleimido-containing groups and pyridine-2-yl-disulfanyl containing group.

Functionalities are groups on Albumin or Fc domain to which reactive groups on modified peptides or polypeptides are capable of reacting with to form covalent bonds. Functionalities include hydroxyl groups for bonding with ester reative entities, thiol groups for reacting with maleimides, maleimido-containing groups or pyridine-2-yldisulfanyl, imidates

and thioester groups; amino groups for bonding to carboxylic acid, phosphoryl groups, acyl groups; and carboxy groups for reacting with hydrazine, hydrazide or hydroxylamine.

Schemes 1 to 3 describe the synthesis of peptide-Linker construct wherein the peptide is a peptide according to anyone of Formulae I to IV.

Scheme 1 describes the synthesis of a maleimide containing linker attached to the N-terminus of a polypeptide of Formula I to IV.

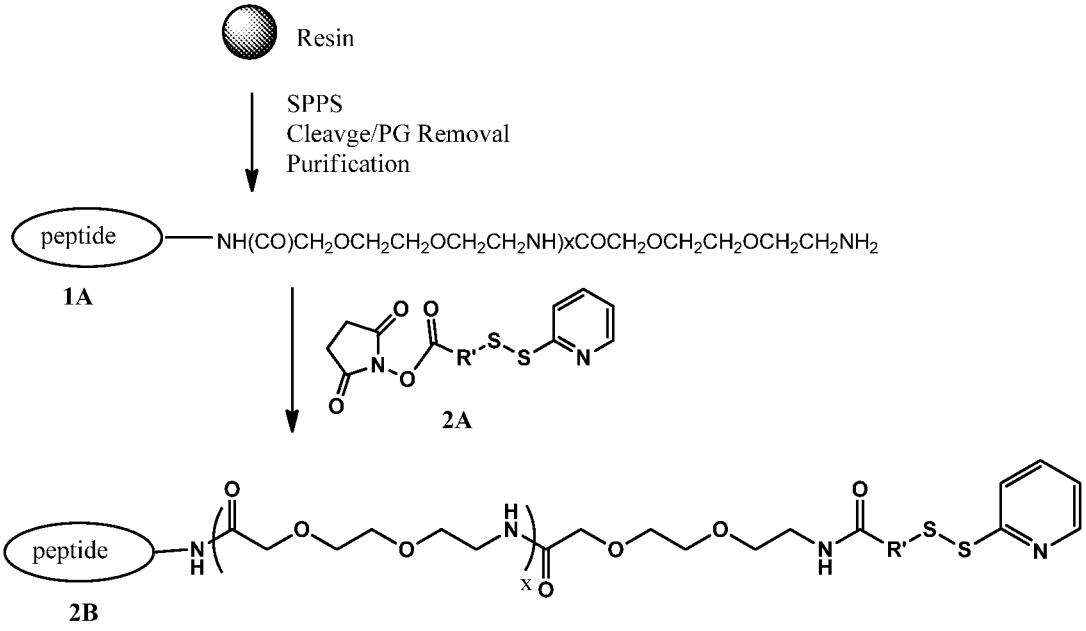


Scheme 1

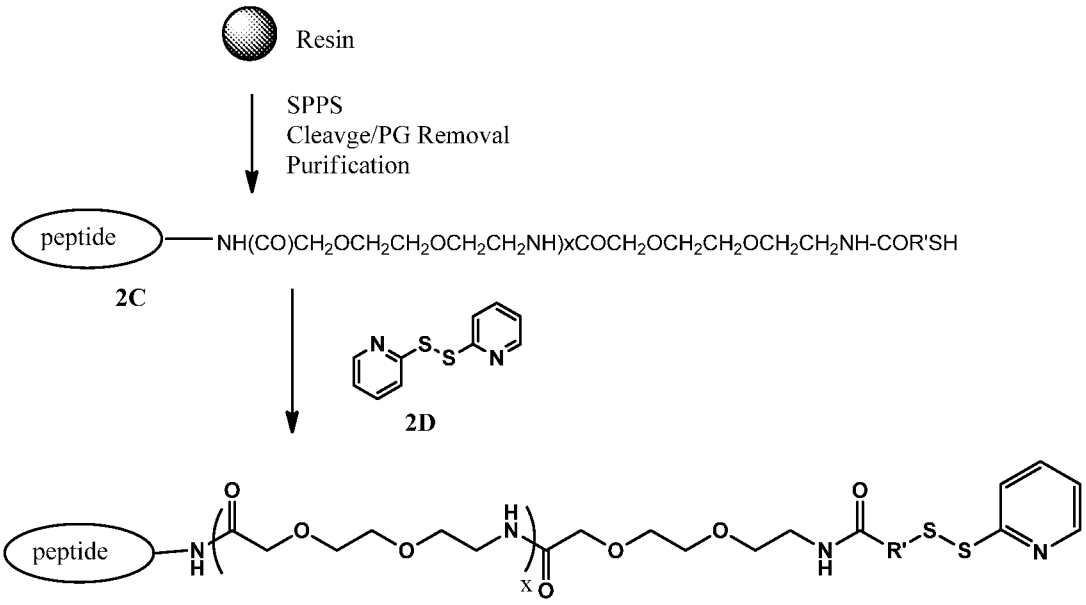
The N-terminus of the peptide is coupled with one or more O2Oc amino acid units (x is 1 to 20, preferably 1 to 10 and more preferably 3 to 6) according to well established amide coupling chemistry to generate (1A). The terminal amino functionality of (1A) is reacted with an activated acid (1B) wherein R is linear or branched alkylene, aryl, heteroaryl, cycloalkyl or combination thereof, in order to generate the peptide-maleimide containing linker construct (1C). The activated acid (1B) is commercially available or readily available from its corresponding carboxylic acid according to technique known to someone of ordinary skill in the art. Preferably, R is a linear alkylene, and more preferably R is $–CH_2-CH_2-$. Alternatively,

for peptides containing an amino functionality in the side chain (for example peptide containing a lysine), orthogonal protecting group such as Alloc is required prior to the coupling reaction, followed by additional deprotection step in order to obtain (1C).

Scheme 2A and 2B describe the synthesis of pyridine-2-yl-disulfanyl containing linker attached to the N-terminus of a polypeptide according to any one of Formula I to IV.



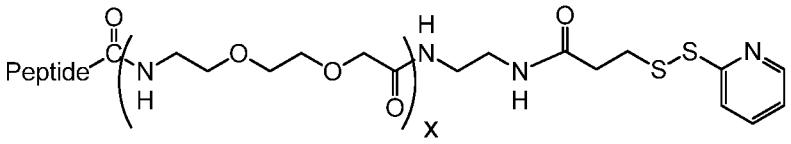
Scheme 2A

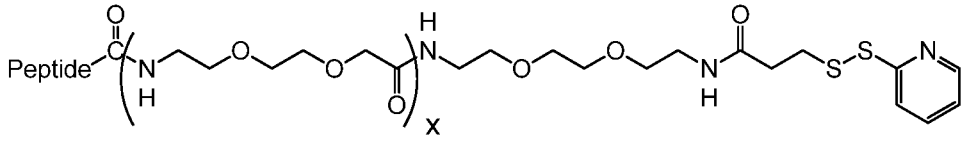


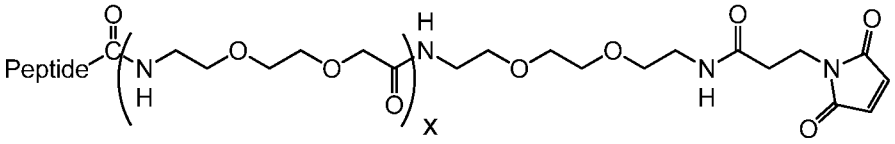
Scheme 2B

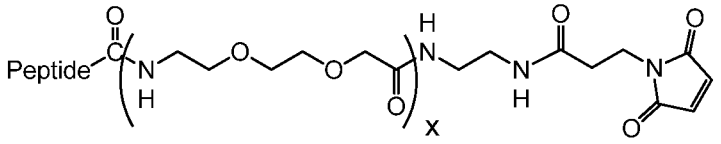
Peptide-Linker construct (1A) is prepared as described in Scheme 1 and is further reacted with an activated acid of Formula (2A) wherein R' is a linear or branched alkylene, to generate a peptide-pyridine-2-yl-disulfanyl containing linker construct (2B). Activated acid (2A) is commercially available or is readily available from its corresponding carboxylic acid according to techniques known to someone of ordinary skill in the art. Preferably R' is is –CH_2-CH_2-. Alternatively, Peptide-linker construct (2C) can be prepared using HO_2C-R'-SH, or a protected form thereof (e.g. trityl or Acm groups, requiring additional deprotection steps), and further reacted with (2D) to generate peptide-pyridine-2-yl-disulfanyl containing linker construct (2B).

Similar reactive groups are attached to the C-terminus of the peptide in a similar way as decribed in Schemes 1, 2A and 2B using a diamino unit such as for example –NH-CH_2CH_2-NH- or –NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-. Non limiting examples of such peptide-linker conducts are:

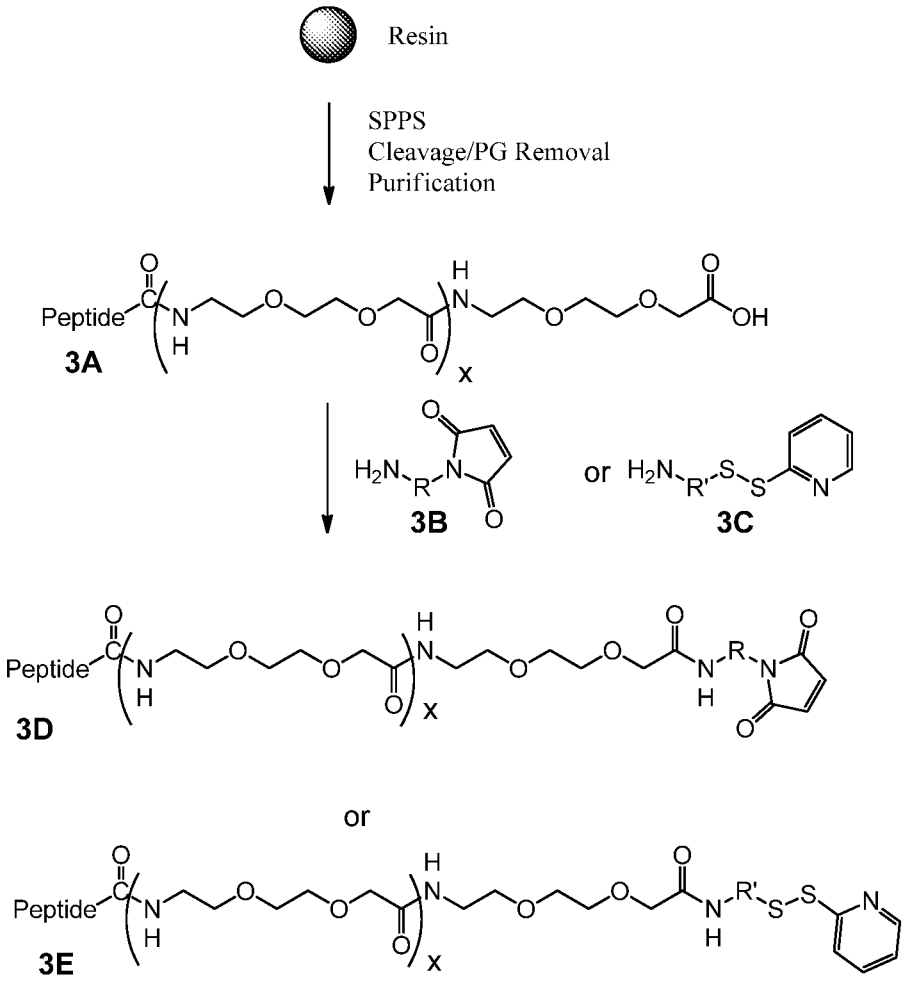






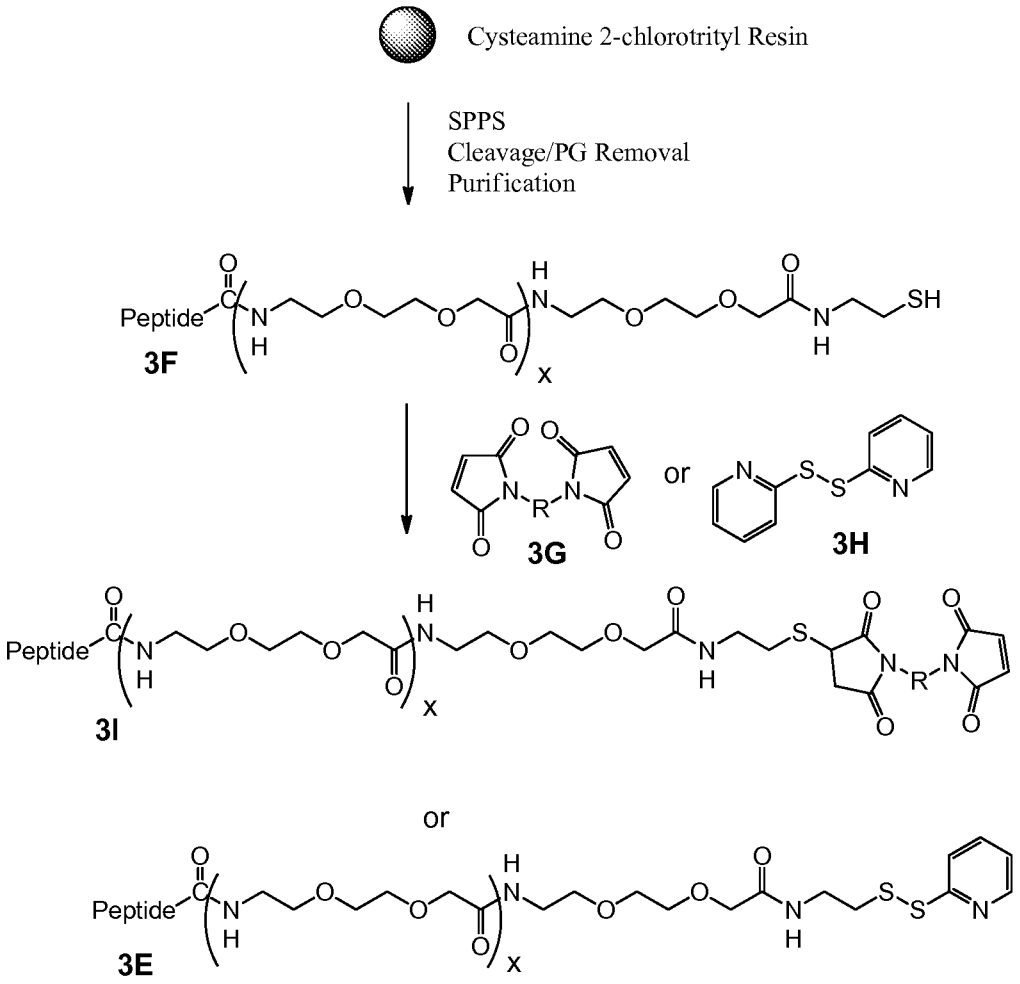


Alternatively maleimide or pyridine-2-yl-disulfanyl reactive group can be attached to a polypeptide according to any one of Formula I to IV according to scheme 3A, 3B and 3C:



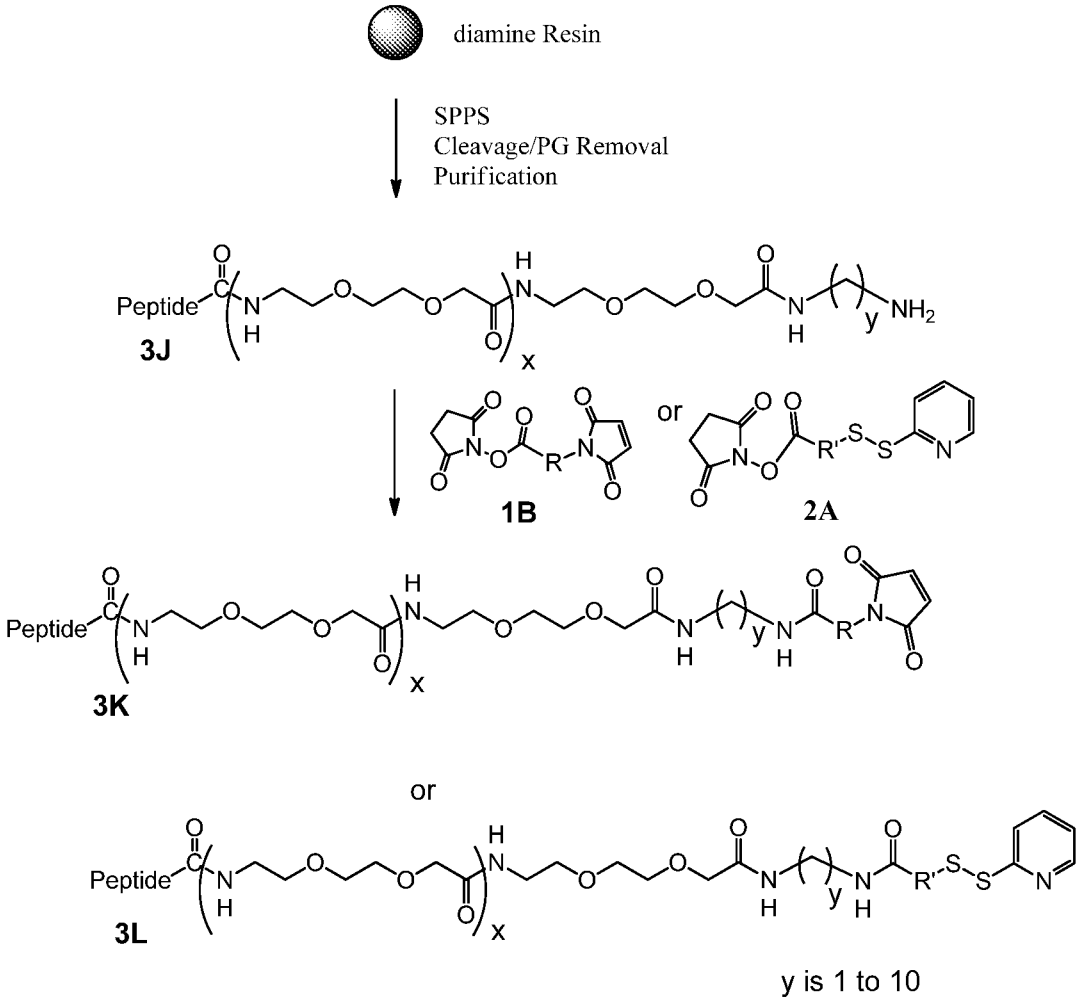
Scheme 3A

The carboxylic acid group at the C-terminus of the peptide is coupled with one or more O2Oc amino acid units using standard amide coupling conditions to generate (3A). The terminal carboxylic acid functionality reacts with the amino group of (3B) or (3C) wherein R and R' are as defined above, in order to generate the activated Peptide-Linker Constructs (3D) or (3E). Additionally, when a peptide contains a carboxy functionality side chain (e.g. Glu or Asp), orthogonal protecting group (e.g. O-Allyl) and additional deprotection steps are required.



Scheme 3B

Peptide-Linker Conctruct 3F can be obtained using a cysteamine 2-chlorotrityl Resin and then reacted with 3G or 3H to generate peptide-linker construct 3I or 3E respectively.

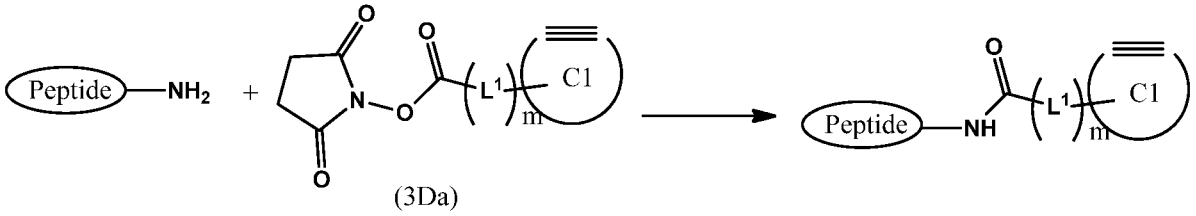


Scheme 3C

Peptide-Linker Construct (3J) can be obtained from a diamine resin and be further reacted with (1B) or (2A) to generate a Peptide-Linker Construct of Formula (3K) or (3L) respectively.

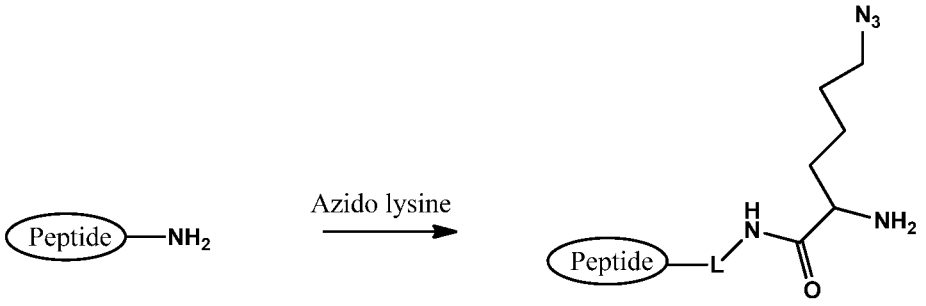
Schemes 1 to 3C describe Peptide-Linker Constructs, more particularly for use in the preparation of a bioconjugate with Albumin. The maleimide reactive group and the pyridine-2-yl-disulfanyl reactive group reacts with the –SH functionality of Cysteine 34 of the albumin.

Schemes 3D and 3E describes preparation of peptide-linker constructs for use in an azide-alkyne Huisgen cycloaddition, more commonly known as click chemistry.



Scheme 3D

wherein m is 0 or 1, C1 is a mono, di or tricyclic carbocyclic or heterocyclic ring system optionally substituted with fluorine, L^1 is a C1-C20 alkylene linker wherein the alkylene chain is optionally substituted with oxo (=O), and wherein one or more carbon is replaced with O or NH. Cycloalkyne moieties (3Da) are readily available from commercial sources. Additionally, cyclic alkyne in click chemistry for protein labeling has been described in US 2009/0068738 which is herein incorporated by reference. Specific examples have been described below (example 20). The click handle can be introduced at the N-terminus of the peptide or on a lysine residue side chain.

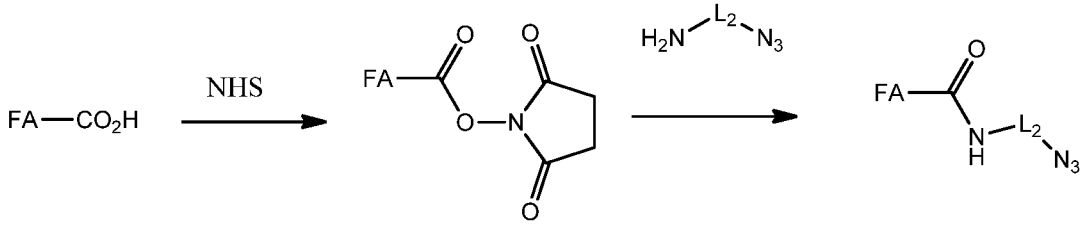


Scheme 3E

Scheme 3E describes the introduction of an Azido lysine residue at the N-terminus of an apelin peptide optionally via a linker L (such as for example one or more amino acids selected from Glycine and serine). The azide functionality acts as a handle for click chemistry. Specific examples have been described in co-filed application (attorney docket number PAT055418-US-PSP2).

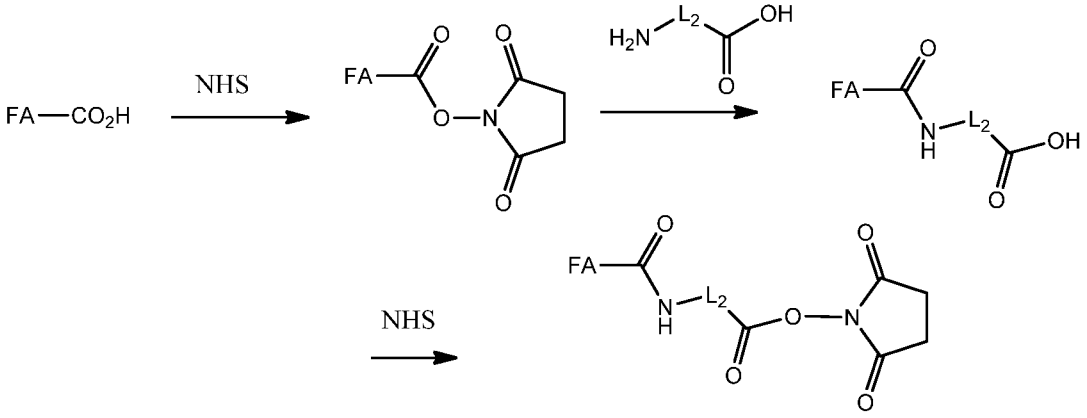
Preparation of half-life extending moiety-linker construct:

Scheme 3F and 3G describes the preparation of a fatty acid-linker construct.



Scheme 3F

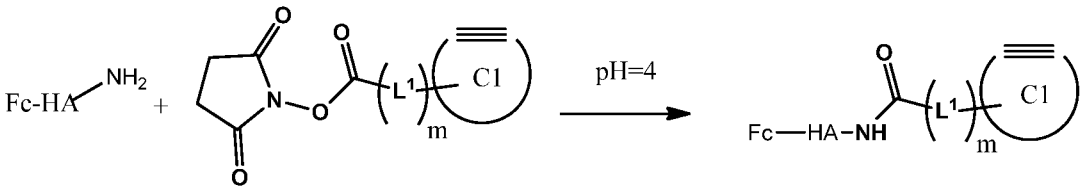
wherein FA is fatty acid, L2 is a linking moiety (for example PEG), NHS is N-hyrdoxysuccinimide. Such fatty acid-linker constructs are used for conjugation using click chemistry. In instances wherein the fatty acid contains functionalities such as hydroxyl or additional carboxylic acid, protection of such functionalities may be required.



Scheme 3G

Wherein FA, NHS and L2 are defined above in Scheme 3F. Such fatty acid constructs are used for conjugation with an amino functionality on the peptide, preferably the N-terminus.

Scheme 3H describes the preparation of a Fc-linker construct



Scheme 3H

AH-Fc is a construct containing the sequence AH- at the N-terminus of the Fc. The construct is prepared using recombinant methods. The AH-sequence allows for selective modification of the N-terminus at a low pH. Such selective modification has been disclosed in cofiled applications (US provisional application No. 62/015868: attorney docket number PAT056275-US-PSP and US provisional application No. 62/015862 : PAT056274-US-PSP). Click handle is therefore introduced at the N-terminus of the Fc construct.

In yet another embodiment, the Fc construct is modified at the C-terminus to introduce a small Sortase recognition motif (LPXTG/A).
Such Fc-recognition motif is prepared using recombinant methods. Example of such construct is: Fc-[GGGG]n-LPETGGLEVLFQGP wherein the GGLEVLFQGP is clipped during sortase treatment.

Preparation of the Fc APJ peptide fusion protein

The biologically generated multimerized molecule, such as an antibody Fc comprising at least a part of cysteine containing region known as the hinge can be prepared from recombinant expressed protein product which has been secreted in multimerized (e.g. dimeric) form. The present invention also include modified Fc fusion proteins wherein the amino acid sequence of the Fc region has been altered relative to the amino acid sequence of the Fc- or constant region found in a naturally occurring antibody. For example, Fc-fusion protein may be engineered (i.e. modified) with mutations in order to obtain desired characteristics of FcRn binding affinity/or serum half-life. Example of modified Fc-fusion proteins have been disclosed in US patent Number 7,217,798, which is incorporated by reference.

Fc-fusion proteins of this invention may also be altered synthetically, e.g. by attachment of the linker moiety and the peptide or polypeptide moiety. In addition, “modified” Fc-fusion proteins with Fc domain derived from recombinant antibodies can be made in any expression systems including both prokaryotic and eukayotic expression system or using phage display methods.

Fc-Linker Constructs such as Fc-[GGGGS], Fc-[GGGGS]2, Fc-[GGGGS]3, Fc-GG and Fc-GS, are described below in the experimental part. The [GGGGS], [GGGGS]2, [GGGGS]3, GS and GG linker are attached either to the C-terminus of the Fc domain or to

the N-terminus of the Fc domain, wherein Fc is a native Fc or a variant thereof. Example of Fc variant includes a Fc wherein the C-terminal Lysine has been deleted or replaced with Alanine. Such Fc variant has been described in co-filed application (attorney docket No PAT055781-US-PSP02)

Bioconjugates

In one embodiment of the present invention, a peptide or polypeptide according to anyone of Formula I to IV is conjugated (chemically/covalently attached) to the thiol functionality of cysteine 34 of the albumin. In one aspect of this embodiment, the Albumin-Peptide refers to a bioconjugate in which the Albumin is conjugated (chemically linked) to the N-terminus of the peptide. In yet another embodiment, the Albumin-Peptide refers to a bioconjugate in which the Albumin is conjugated (chemically linked) to the C-terminus of the peptide.

In another embodiment of the present invention, a peptide or polypeptide according to anyone of Formula I to IV is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as “Fab,” that binds an antigen, and a constant domain known as “Fc,” that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas a Fab is short-lived (Capon et al., 1989, Nature 337: 525-31). when joined together (with a therapeutic peptide or polypeptide, an Fc domain can provide longer half-life (C. Huang, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, 20, 692-699).

In one embodiment, the Fc-Peptide refers to a bioconjugate in which the Fc sequence is fused to the N-terminus of the peptide according to anyone of Formulae I to IV. In another embodiment, Peptide-Fc refers to a bioconjugate in which the Fc sequence is fused to the C-terminus of the peptide.

The Fc region can be a naturally occurring Fc region, or can be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Useful modifications of protein therapeutic agents by fusion with the “Fc” domain of an antibody are discussed in detail in PCT Publication No. WO 00/024782. This document discusses linkage to a “vehicle” such as polyethylene glycol (PEG), dextran, or an Fc region.

Preferred embodiments of the invention are bioconjugate comprising a peptide or polypeptide according to anyone of preceding embodiments and a half life extending moiety, wherein the half-life extending moiety is a Fc domain fused to a polypeptide of Formula I, III, IV or V via a linker. In one aspect of this invention, the linker has the following Formula: -[GGGGS]n-, n is 1, 2 or 3 or the linker is GG or GS, and the polypeptide of Formula I, II, III or IV contains naturally occurring amino acids. Examples of polypeptides of Formula I, II, III or IV suitable for fusion with the Fc domain are: QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF and QRC*RLSC*KGPMPF. One preferred aspect of this embodiments are Fc-Peptide fused bioconjugate as defined above, comprising a modified Fc fragment (e.g., an FcLALA) and a peptide or polypeptide of anyone of Formulae I to IV, as defined herein.

In yet another embodiment, the invention pertains to a bioconjugate according to any one of the preceding embodiments wherein the half-life extending moiety is a modified Fc domain wherein the C-terminal Lysine has been deleted or replaced with Alanine.

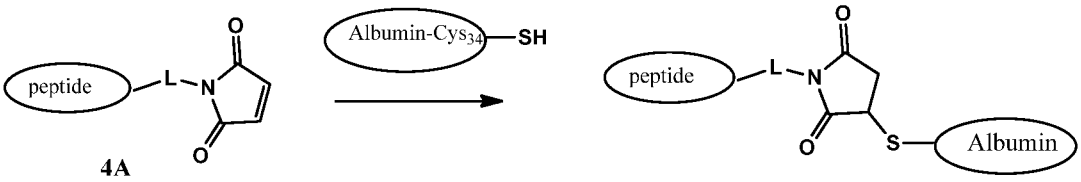
Peptides fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life in vivo than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the polypeptide.

In another embodiments of the invention are bioconjugate comprising a peptide or polypeptide according to anyone of Formulae I-IV and a half life extending moiety, wherein the half-life extending moiety is a Fc domain which is chemically linked to a polypeptide.

Preparing conjugates:

Schemes 4 and 5 illustrate chemical reactions for conjugation of an APJ agonist peptide or a peptide according to anyone of Formula I to IV and a half-life extending moiety such as an Fc domain or albumin.

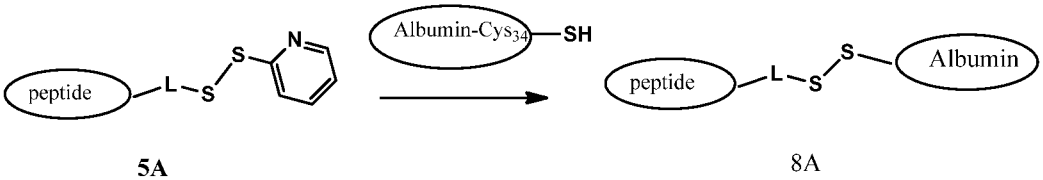
Scheme 4 illustrates the conjugation of a peptide-linker of Formula 4A with Cysteine 34 of Albumin



Scheme 4

wherein L represent a linking moiety between the peptide and the maleimide functionality. In a particular embodiment, L is a linking moiety as disclosed in Scheme 1, 3A, 3B or 3C.

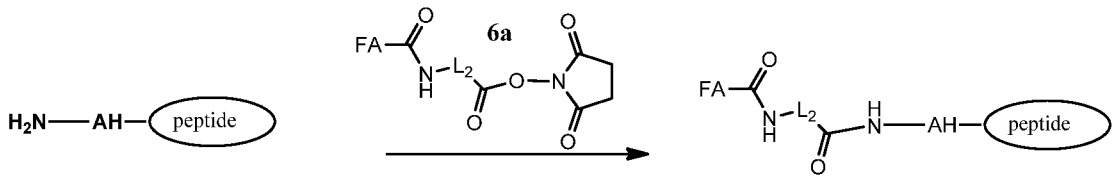
Scheme 5 illustrates the conjugation of a peptide-linker construct of Formula 8A with Cysteine 34 of Albumin.



Scheme 5

wherein L represents a linking moiety between the peptide and the –S-S-Pyridine functionality. In a particular embodiment, L is a linking moiety as disclosed in schemes 2, 3A, 3B or 3C.

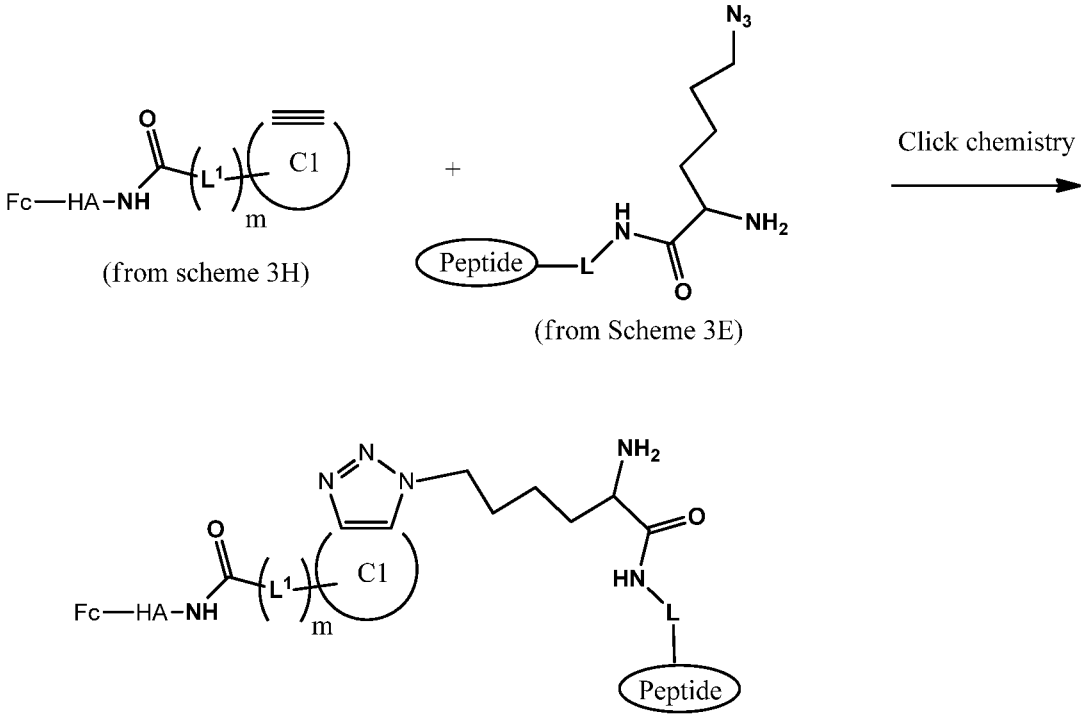
Other method of conjugation have been described in copending and co-filed application (US provisional application No. 62/015862 : attorney docket numbers PAT056274-US-PSP, US provisional application No. 62/015868:PAT056275-US-PSP and US provisional application No. 62/015848 PAT055781-US-PSP02). Such method includes selective N-acylation of a peptide and is summarized in Scheme 6.



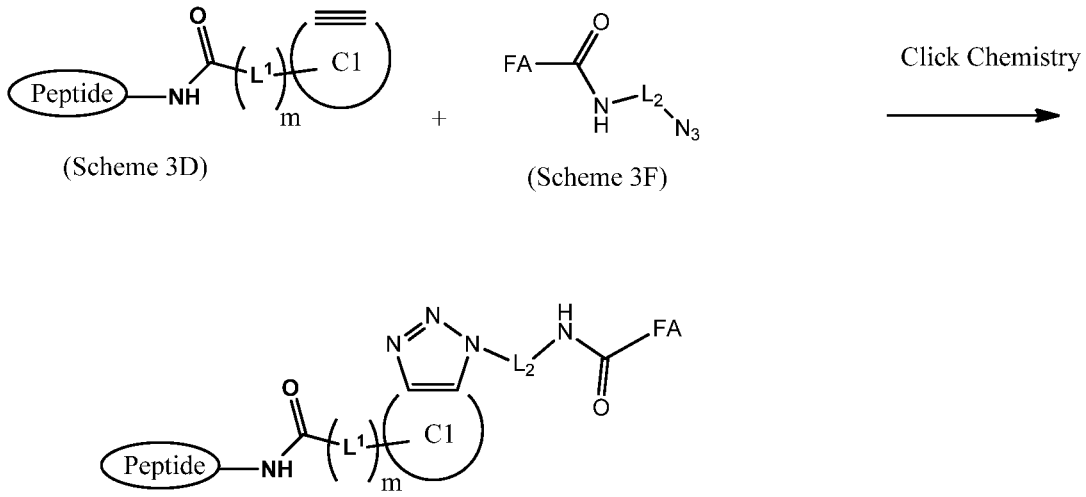
Scheme 6

wherein AH- is a linker introduced on N-terminus of the peptide to facilitate reaction at the N-terminus, H is histidine, A is Alanine, FA is a fatty acid as described supra, for example a fatty acid of Formula A1 to A3, and L is a linking moieties (for example a PEG linking moiety). The Fatty acid Linker construct 6a (prepared as shown in Scheme 3G) is selectively introduced onto the peptide at the N-terminus when using low pH condition. Such method has been described in cofiled patent applications (US provisional application No. 62/015868: attorney docket number PAT056275-US-PSP and US provisional application No. 62/015848 PAT055781-US-PSP02).

Schemes 7 and 8 describes formation of conjugates according to the instant invention using click chemistry.



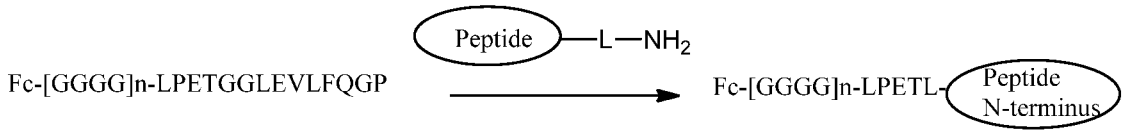
Scheme 7



Scheme 8

Methods for making conjugates and peptide-linker constructs as described in Schemes 1-5 have also been described and exemplified in co-filed US applications (US provisional application no. 61/858 251: Attorney dockets numbers: PAT055326-US-PSP3 and US provisional application No. 61/858303: PAT055781-US-PSP) which are hereby incorporated by reference.

Scheme 9 describes the conjugation of an APJ peptide with a Fc construct using a sortase enzyme



wherein n is 1, 2 or 3, L is an optional linker (for example a polyglycine linker)

Pharmaceutical compositions

The polypeptides of the instant invention, or an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate thereof, may be administered in any of a variety of ways, including subcutaneously, intramuscularly, intravenously, intraperitoneally, intranasally, inhalationally, orally 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 or a bioconjugate thereof. The polypeptides or bioconjugates of 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 or bioconjugates 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 or bioconjugate administration is provided for at least about one week. In other embodiments, intermittent or continuous polypeptide or bioconjugate 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. Alternatively, the peptides and conjugates thereof could be delivered orally via FcRn mechanism. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262–G270, 2013).

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 or a bioconjugate 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, 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 sterilization and/or can contain conventional inert diluents, 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, 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 filtered 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.

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.

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, or bioconjugate thereof, 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, or bioconjugate thereof, 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 IV, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, or a bioconjugate thereof, 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, or bioconjugates 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate 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 term "a therapeutically effective amount" of a polypeptide of the present invention or a bioconjuagte thereof, refers to an amount of the polypeptide of the present invention (or bioconjugate) 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 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: (peptides)

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.

Sample Preparation Procedure (Conjugates)

Test article is prepared at 50,000 ng/mL by adding 5 uL of 1 mg/mL Working solution to 495 uL of rat plasma. The samples are incubated at 37°C with gentle shaking (65~75rpm) in a water bath incubator. At times 0hr, 0.5hr, 1hr, 2hr, 4hr, 6 and 24hr, 50 uL aliquots of incubation samples are transferred to 96-well plate and 100 uL 40 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) are added to each sample. The reaction mixture is incubated at 37°C for 1 hour. After completion of reaction, protein precipitation is performed using 300uL of acetonitrile. The sample plate is centrifuged at 4000 rpm at 4 °C for 10 minutes. Afterwards, a pipetting device (Tecan Temo) is used to tranfer 125 uL supernatants to another plate and adds 50 uL of water to all samples. The plate is 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	9.4	8
Example 2	3.2	39
Example 3	64.5	n.d.
Example 4	74.6	506
Example 5	1.6	5.0
Example 6	21.4	5
Example 7	11.8	9
Example 8	13.1	662.5
Example 9	23.4	109.2
Example 10	46.9	57.4
Example 11	32.2	32.8
Example 12	21.4	10
Example 13	12.2	10
Example 14	48.7	7.5
Example 15	193.5	17.7
Example 16	14.1	7
Example 17	410.3	11.4
Example 18	174	50
Example 19	79.3	50
Example 20	1.0	11.9
Example 21	2.9	>1000
Example 22	3.3	>1000
Example 23	72.2	3157

Example 24	85.8	1699
Example 25	227	>1000
Example 26	2292	52
Example 27	86.5	82
Example 28	3.1	13
Example 29	4.2	705.0
Example 30	0.4	660.7
Example 31	0.5	43.1
Example 32	3.0	>1000
Example 33	1.9	>1000
Example 34	0.6	>1000
Example 35	2.0	155.0
Example 35	66.7	8
Example 36	4.2	34
Example 37	937	47
Example 38	175	41
Example 40	2479	>1000
Example 41	839	>1000
Example 42	16.3	>1000
Example 43	28.9	>1000
Comparative Example: Pyr1-apelin-13	1.8	5.0

Table 3: Correlation between plasma stability assay and surrogate activity based plasma stability assay:

Peptide	Plasma stability t½ [min]	Surrogate Activity based Plasma stability t½ [min]
Pyr-1-Apelin 13	6.6	5.0
Ex 32	377	>1000

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

The polypeptide of the present invention, or bioconjugate thereof, 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, or a bioconjugate thereof, has a plasma stability of at least 30 minutes. In another embodiment, the polypeptide of the invention, or a bioconjugate thereof, has a plasma stability of at least 60 minutes, or at least 80 min, preferably at least 100 minutes and more preferably at least 150 minutes.

The polypeptide of the present invention, or a bioconjugate thereof, may be administered either simultaneously with, or before or after, one or more other therapeutic agent. The polypeptide or bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate thereof, and the other therapeutic agent(s) together in the same pharmaceutical composition, or a polypeptide of anyone of formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 to IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate 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 peptide or bioconjugate of the invention and the other therapeutic agent may be manufactured and/or formulated by the same or different manufacturers. Moreover, the peptide or bioconjugate 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 or bioconjugate of the invention and the other therapeutic agent.

Accordingly, the invention provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate thereof.

The invention also provides a polypeptide of anyone of formulae I to IV, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof. The invention also provides a polypeptide of anyone of formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate thereof.

The invention also provides the use of a polypeptide of anyone of formulae I to IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 or bioconjugate of the invention (*e.g.*, a polypeptide according to anyone of Formulae I-IV 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 peptide to bioconjugate 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.

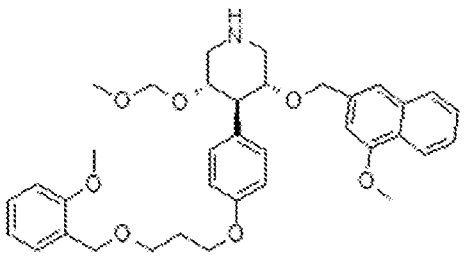
The term “HMG-Co-A reductase inhibitor” (also called beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-co-enzyme-A reductase inhibitors) includes active agents that may be used to lower the lipid levels including cholesterol in blood. Examples include atorvastatin, cerivastatin, compactin, dalvastatin, dihydrocompactin, fluindostatin, fluvastatin, lovastatin,

pitavastatin, mevastatin, pravastatin, rosuvastatin, rivastatin, simvastatin, and velostatin, or, pharmaceutically acceptable salts thereof.

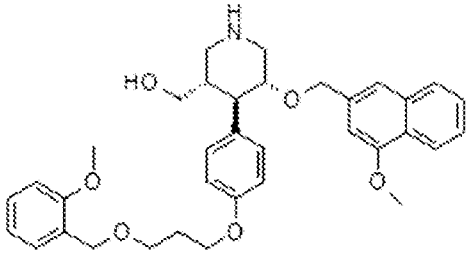
The term “ACE-inhibitor” (also called angiotensin converting enzyme inhibitors) includes molecules that interrupt the enzymatic degradation of angiotensin I to angiotensin II. Such compounds may be used for the regulation of blood pressure and for the treatment of congestive heart failure. Examples include 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.

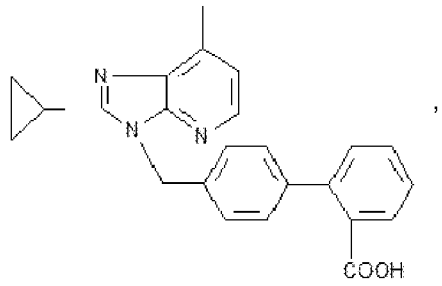
The term “calcium channel blocker (CCB)” includes dihydropyridines (DHPs) and non-DHPs (*e.g.*, diltiazem-type and verapamil-type CCBs). Examples include amlodipine, Bepridil, Diltiazem, felodipine, ryosidine, isradipine, lacidipine, nicardipine, nifedipine, niguldipine, niludipine, nimodipine, nisoldipine, 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)

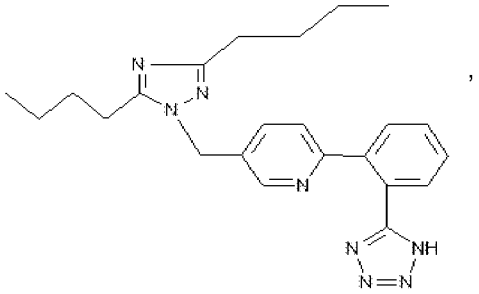
An angiotensin II receptor antagonist or a pharmaceutically acceptable salt thereof is understood to be an active ingredient which bind to the AT_1-receptor subtype of angiotensin II receptor but do not result in activation of the receptor. As a consequence of the inhibition of the AT_1 receptor, these 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

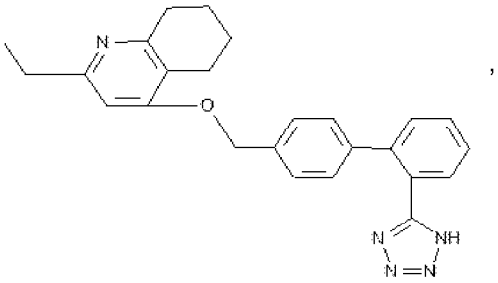


,

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



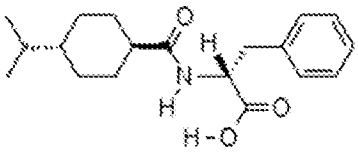
and the compound with the designation ZD-8731 of the following formula



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 -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 IV, or an amide, an ester, a salt thereof, or a bioconjugate 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.

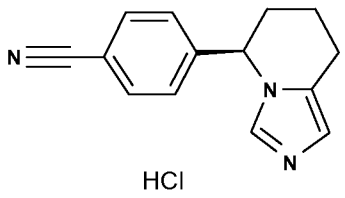
The term “obesity-reducing agent” includes lipase inhibitors (*e.g.*, orlistat) and appetite suppressants (*e.g.*, sibutramine and phentermine).

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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof or a bioconjugate 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 IV, or a bioconjugate thereof, 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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 IV, or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate 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
ε-Ahx	ε-Amino hexanoic acid

AM	Aminomethyl
BAL	Backbone amide linker
BSA	Bovine Serum Albumin
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
DCM	Dichlormethane
DIC	*N,N'*-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	*N,N'*-Diisopropylethylamine
DMA	*N,N'*-Dimethylacetamide
DMF	*N,N'*-Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
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
HSA	Human serum albumin
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
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
PBS	Phosphate buffered saline
Ph	Phenyl
PhP	Phenylproline
Pip	Pipecolic acid
Pol	Polymeric support
PS	Polystyrene
rt	Room temperature
SEC	Size exclusion chromatography
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TBME	*tert*-Butylmethylether
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
*t*BuOH	*tert*-Butanol
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TIS, TIPS	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) and Liberty microwave peptide synthesizer (CEM Corporation, North Carolina, USA). Peptides with a free carboxylic acid on the C-terminus or with an N,N-disubstituted carboxamide on the C-terminus were synthesized from 2-chlorotrityl chloride-PS-resin (ABCR, Karlsruhe, Germany or AnaSpec, Inc., California, USA). 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 Atlantis Prep OBD T3 Column, 5 µm, 30x150 mm, Part No.186003703
- Waters SunFire Prep C18 OBD Column, 5 µm, 30x50 mm, Part No. 186002572

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 and UPLC-MS 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 italic *H-* or *-OH*, respectively.

Table 4

Example	Sequence
Example 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Phenethyl)*
Example 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Example 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Example 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Example 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Example 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Phenethyl)*
Example 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Example 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Phenethyl)*
Example 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

Example 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Example 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 20	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 21	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 22	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 23	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 24	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 25	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH_2*
Example 26	*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Example 27	*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
Example 28	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Example 29	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Example 30	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Phenethyl)*
Example 31	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Phenethyl)*
Example 32	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)*
Example 33	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 34	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
Example 35	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 35	*H*-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
Example 36	*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Example 37	*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
Example 38	*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

wherein the two amino acids labeled with "*" represent the amino acids forming a disulfide or amide bond via their side chain.

Analytical Methods

1a) HPLC - Analytical Method A

- Column: Waters Xbridge™ C18 (50x4.0 mm), 3.5 µm; Part n°: 186003031

- 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	95	5
10.0	0	100
12.0	0	100
12.2	95	5

1b) HPLC - Analytical Method B

- Column: XBridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 µm; Part n°: 186003612
- Eluent A: 0.1% TFA in water / Eluent B: 0.1% TFA in ACN
- Flow: 1.0 ml/min
- Temperature: 40 °C
- Gradient:

Time [min]	A [%]	B [%]
0.0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

2a) UPLC-MS - Analytical Method C

- Column: Acquity UPLC® BEH300 C18 (50x2.1 mm), 1.7 µm; Part n°: 186003685
- Eluent A: 0.05% TFA in water / Eluent B: 0.04% TFA in ACN
- Flow: 1.0 ml/min
- Temperature: 80 °C
- Gradient:

Time [min]	A [%]	B [%]
0.0	100	0
0.2	100	0

4.4	2	98
4.8	2	98
4.9	100	0
5.0	100	0

2b) UPLC-HRMS - Analytic Method D

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; Part n°: 186002350
- Eluent A: 0.05% FA +3.75 mM ammonium acetate in water; Eluent B: 0.04% FA in ACN
- Flow: 1.0 ml/min
- Temperature: 50 °C
- Gradient: 2 to 98% in 4.4 min

3) Analytical Method E:

- XBridge C18 Column, 3.5 µm, 3.0 x 30 mm
- Eluent: A: Water (0.1% formic acid); B: CAN
- Flow rate: 2 mL/min
- Gradient: 0 min 40% B; 40% to 95% B in 1.70 min; 2.0 min 95% B; 2.1 min 40%B
- Mass Spectrometer: Single Quadrupole ESI scan range 150-1600
- HPLC: Agilent 1100 series
- Temperature: 40C

3) Analytical Method F:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm
- Eluent: A: Water (0.1% formic acid); B: ACN (0.1% formic acid)
- Flow rate: 1 mL/min
- Gradient: 0 min 2% B; 2% to 98% B in 1.7 min; 2.06min 98% B; 2.16min 2% B
- Mass Spectrometer: Single Quadrupole ESI scan range 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperature: 50C

3) Analytical Method G:

- Acquity BEH 1.7µm 2.1x50mm

- Eluent: A: Water (0.1% formic acid); B: ACN (0.1% formic acid)
- Flow rate: 1 mL/min
- Gradient: 0 min 40% B; 40% to 98% B in 1.40 min; 2.05 min 98% B; 2.1 min 40%B
- Mass Spectrometer: Single Quadrupole ESI scan range 120-1600
- HPLC: waters Acquity
- Temperature: 50C

The analytical data for peptides of **Examples 1** to **38** 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	3.48	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
Example 2	3.66	A	735.4	490.6	C	735.4	490.6
Example 3	3.60	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
Example 4	2.65	A	683.4	455.9	C	683.4	455.9
Example 5	3.95	A	782.4	521.9	C	782.4	521.9
Example 6	3.49	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
Example 7	3.55	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
Example 8	2.85	A	719.3	479.9	C	719.4	479.9
Example 9	3.75	A	742.4	495.3	C	742.4	495.3

Example 10	3.55	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
Example 11	3.57	A	686.9	458.3	C	686.9	458.2
Example 12	3.51	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
Example 13	3.54	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
Example 14	3.46	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
Example 15	3.44	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
Example 16	3.59	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
Example 17	3.61	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
Example 18	7.60	B	775.391	517.263	D	775.385	517.256
Example 19	7.40	B	751.392	501.263	D	751.385	501.256
Example 20	3.41	A	743.4	495.9	C	743.4	495.9
Example 21	7.35	B	730.355	487.239	D	730.361	487.241
Example 22	8.62	B	739.877	493.587	D	739.856	493.573
Example 23	7.32	B	737.374	491.918	D	737.377	491.921
Example 24	7.35	B	737.375	491.919	D	737.377	491.921
Example 25	5.63	B	620.822	414.217	D	620.825	414.219
Example 26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241

Example 27	7.36	B	737.374	491.918	D	737.369	491.913
Example 28	3.63	A	713.9	476.2	C	713.8	476.2
Example 29	3.78	A	720.9	480.9	C	720.9	480.9
Example 30	3.82	A	691.9	461.6	C	691.8	461.6
Example 31	3.74	A	643.3	429.2	C	643.3	429.2
Example 32	8.01	B	643.328	429.222	D	643.324	429.252
Example 33	7.73	B	700.832	467.557	D	700.845	467.566
Example 34	7.17	B	609.809	406.875	D	609.810	406.876
Example 35	8.99	B	710.351		D	710.332	473.890
Example 35	6.89	B	568.289	379.196	D	568.292	379.197
Example 36	7.69	B	724.843	483.564	D	724.837	483.558
Example 37	6.62	B	715.848	477.568	D	715.843	477.562
Example 38	8.28	B	728.873		D	728.869	

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 3-16 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 x V_t x V) / (d x ε x V_a x m)

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

2) Solid phase peptide synthesis

2a) Synthesis Cycle A on Prelude™ synthesizer

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with piperidine/DMA (1:4) or 4-methylpiperidine/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.

2a) Synthesis Cycle B on Prelude™ synthesizer

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 C on Prelude™ synthesizer

The resin was washed with DMA. Fmoc was removed by repetitive treatment with piperidine/DMA (1:4) or 4-methylpiperidine/DMA (1:4). The resin was washed 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 D on Liberty™ synthesizer

The resin was washed with DMF and DCM. Fmoc was removed by treatment with 20% piperidine/DMF (typically 7 ml per 0.1 mmol twice). The resin was washed with DMF and DCM. Coupling was done by addition of the Fmoc-amino acid (5 eq.; 0.2 M solution in DMF), HCTU (5 eq.; 0.5 M solution in DMF), and DIPEA (10 eq.; 2 M solution in NMP) followed by mixing of the suspension with nitrogen at 75 or 50 °C for typically 5 to 50 min with microwave power 0 to 20 watts depending on the specific requirements. After washing with DMF the coupling step might be repeated once depending on the specific requirements. The resin was washed with DMF.

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-

20 mL), the suspension was centrifuged and the supernatant was poured off. This step was performed 1-2-times. The solid was dried in high vacuum.

3b) Cleavage Method B

The resin (0.1 mmol) was shaken at rt for 3 h with 95% aq. TFA//TIS/DTT (95:2.5:2.5) (3 mL). The cleavage solution was filtered off. The resin was rinsed once with 95% aq. TFA (1 mL). The combined cleavage and washing solutions were poured slowly onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (10-15 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. Diethyl ether (10mL) was added to the residue, the suspension was vortexed for 3 min and centrifuged, and the supernatant was poured off, The wash process was repeated twice. The solid was dried in high vacuum.

3c) Cleavage Method C

HFIP/DCM (1:3) (3 mL) was added to the resin (0.1 mmol) and the suspension was shaken at rt for 20 min. The cleavage solution was filtered off and collected. This procedure was repeated twice. Finally the resin was washed once with HFIP/DCM (1:3) (1 mL). The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in vacuo. The crude product was lyophilized from ACN/H_2O.

4) Disulfide formation

4a) Cyclization Method A

The fully deprotected linear precursor peptide was dissolved in H_2O/DMSO (9:1) or (4:1) to give typically a concentration of 0.5-7 mM. The reaction mixture was then stirred at rt for typically 16-96 h depending on the requirements and then concentrated to dryness in high vacuum.

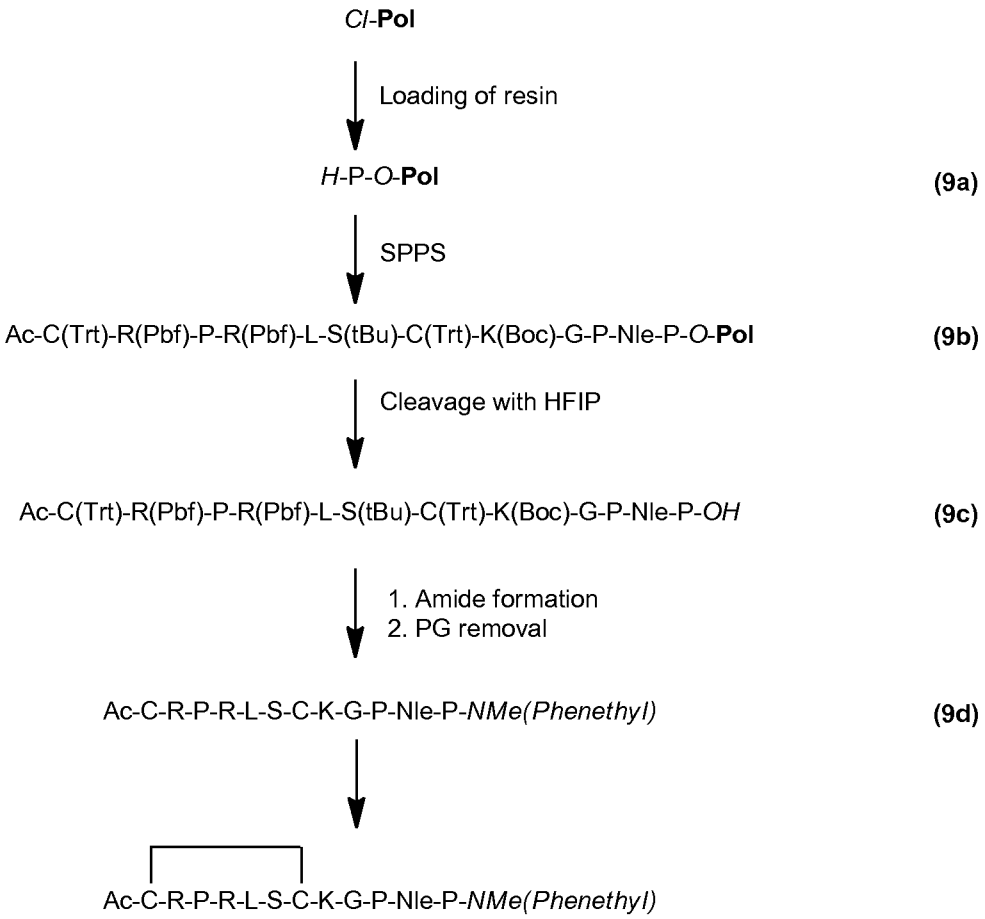
4b) Cyclization Method B

The fully deprotected linear precursor peptide (1 eq.) was dissolved in H_2O to give typically a concentration of about 1-25 mM. A solution of 50 mM I_2 in AcOH (1-2 eq.) was added and the

mixture was stirred at rt until complete conversion is achieved. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O was added to quench the excess of I_2.

In the following the syntheses of representative examples are described.

Example 9 Synthesis of Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Phenethyl)* (disulfide C^1-C^7)



Example 9

- Preparation of **Intermediate 9a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-P-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (2.00 g, 3.20 mmol) was washed with DCM (3x). A solution of Fmoc-P-OH (1.08 g, 3.20 mmol) in DCM (20 mL) and DIPEA (2.24 mL, 12.8 mmol) was added and the suspension was shaken for 3 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 twelve times for 2 min with a mixture of piperidine/DMA (1:4) (12 mL each time). The piperidine/DMA solutions were collected for determination of the loading of the resin (see general procedure).

The resin was washed thoroughly with DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) and dried in vacuo to give **Intermediate 9a** (2.25 g; loading = 1.12 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 9b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 9a (89 mg, 0.10 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	Nle	2 x 1 h	B
2	P	2 x 30 min	B
3	G	2 x 1 h	B
4	K(Boc)	2 x 30 min	B
5	C(Trt)	2 x 30 min	B
6	S(tBu)	2 x 30 min	B
7	L	2 x 30 min	B
8	R(Pbf)	4 x 1 h	B
9	P	2 x 1 h	B
10	R(Pbf)	4 x 1 h	B
11	C(Trt)	2 x 1 h	B
12	Ac	1 x 10 min	C

- Preparation of **Intermediate 9c**
  (HFIP cleavage from the resin)

HFIP/DCM (1:3) (3 mL) was added to **Intermediate 9b** (0.100 mmol) and the suspension was shaken at rt for 20 min. The cleavage solution was filtered off and collected. This procedure was repeated twice. Finally the resin was washed once with HFIP/DCM (1:3) (1 mL). The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in vacuo. The crude product was lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 9c** (37.2 mg, 14.8 µmol) as a white solid.

- Preparation of **Intermediate 9d**
  (Amide formation and protecting group removal)

Intermediate 9c (37.0 mg, = 14.7 µmol) and TBTU (7.1 mg, 22.1 µmol) were dissolved in DCM (5 mL). DIPEA (5.1 µl, 29.4 µmol) was added and the solution was stirred for 2 min at rt. N-Methyl-phenethylamine (3.2 µl, 22.1 µmol) was added, the reaction was stirred for 1 h 40 min at rt then partitioned between EtOAc/n-butanol (9:1) (50 mL) and 5% aq. $NaHCO_3$ (5 mL). The organic layer was washed with 5% aq. $NaHCO_3$ (5 mL), brine (5 mL), dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated to dryness in vacuo.

The residue was dissolved in 95% aq. TFA/TIS/EDT (95:2.5:2.5) (5 mL). The reaction mixture was stirred for 3 h at rt then poured on cold heptane/ether (1:1) (35 mL). The suspension was centrifuged and the solvent was decanted. The residue was washed twice with cold diethylether/heptane (1:1) (10 mL) and then dried in vacuo to afford **Intermediate 9d** (27.0 mg, 14.7 µmol) as a beige solid. The product was subjected to the next step without purification.

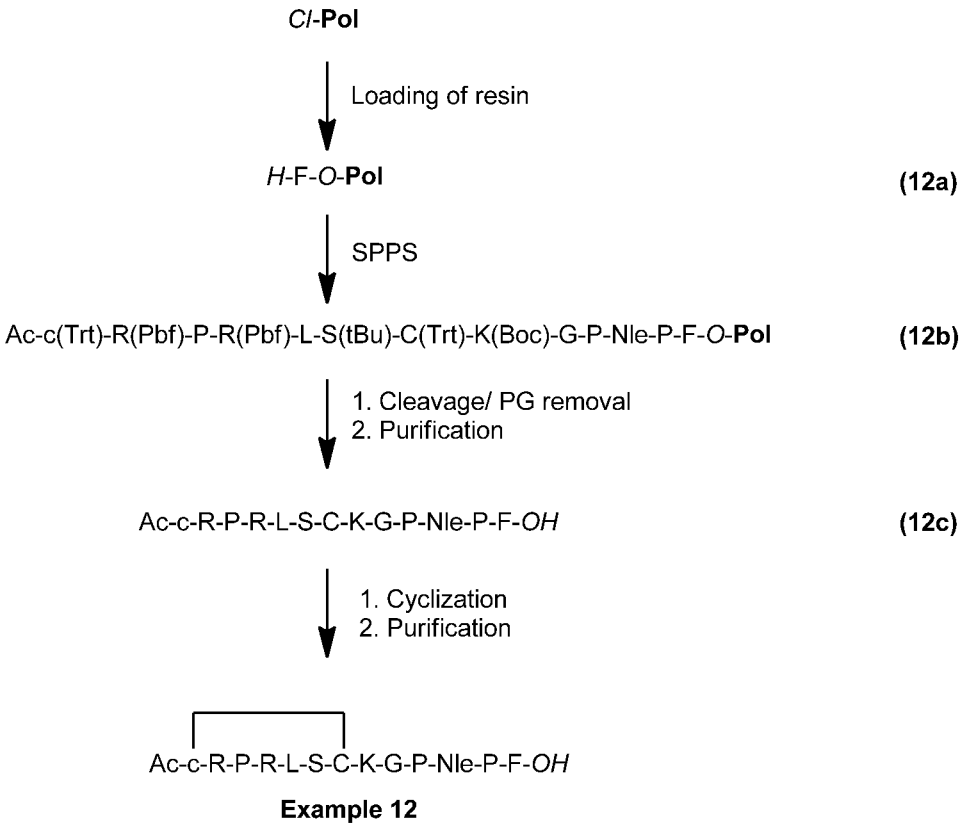
- Preparation of **Example 9**
  (Disulfide formation and purification)

Intermediate 9d (26.9 mg, 14.7 µmol) was dissolved in H_2O (3.7 mL) (solution was slightly cloudy). A solution of 50 mM I_2 in AcOH (0.353 mL, 17.6 µmol) was added and the mixture was stirred at rt for 30 min. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O (0.044 mL, 22.1 µmol) was added to quench the excess of iodine. The solution was concentrated to about 3.5 mL and then

subjected to preparative reversed-phase HPLC. Fractions were lyophilized to afford **Example 9** (6.8 mg, 3.7 μmol) as a white solid.

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A; t_R=3.75 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=495.3; calculated: $[M+3]^{3+}$=495.3).

Example 12 Synthesis of Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH* (disulfide C^1-C^7)



Example 12

- Preparation of **Intermediate 12a**
  (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 washed with DCM (3x). A solution of Fmoc-F-OH (12.4 g, 32.0 mmol) in DCM (100 mL) and DIPEA (11.2 mL, 64.0 mmol) was added and the suspension was shaken for 5 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 twelve times for 2 min with a mixture of piperidine/DMA (1:4) (50 mL each time) followed by washing with DMA (2x). The piperidine/DMA solutions and DMA washing solutions were collected for determination of the loading of the resin (see general procedure).

The resin was washed thoroughly with DCM (3x), DMA (3x), DCM (3x) and dried in vacuo to give **Intermediate 12a** (12.8 g; loading = 0.79 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 12b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 12a (127 mg, 0.10 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	P	2 x 1 h	A
2	Nle	2 x 1 h	A
3	P	2 x 1 h	A
4	G	2 x 2 h	A
5	K(Boc)	2 x 1 h	A
6	C(Trt)	1 x 3 h	A
7	S(tBu)	2 x 1 h	A
8	L	2 x 1 h	A
9	R(Pbf)	4 x 3 h	A
10	P	2 x 2 h	A
11	R(Pbf)	4 x 3 h	A
12	c(Trt)	1 x 3 h	A
13	Ac	1 x 20 min	C

- Preparation of **Intermediate 12c**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal and purification)

Intermediate 12b (0.10 mmol) was carefully washed with DCM (4x). A mixture of 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (2 mL) was added and the suspension was shaken at rt for 2 h. The cleavage solution was filtered off, and fresh cleavage solution (2 mL) was added. The suspension was shaken at rt for 1 h then the cleavage solution was filtered off. Fresh solution (2 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) (30 mL), giving a precipitate. The mixture was centrifuged and the supernatant poured off. The solid was washed again with cold heptane/diethyl ether (1:1) (10 mL), the mixture was centrifuged and the supernatant poured off. The solid was dried in vacuo. The crude product was purified by preparative HPLC and lyophilized to afford **Intermediate 12c** (53 mg, 0.029 mmol).

- Preparation of **Example 12**
  (Cyclization and purification)

Intermediate 12c (53 mg, 0.029 mmol) was dissolved in H_2O/DMSO (9:1) (18 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 40 h then concentrated to dryness in vacuo. The crude product was purified by preparative HPLC and lyophilized to afford **Example 12** as a white solid (27.4 mg; 0.014 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method A; t_R=3.51 min) and UPLC-MS (Analytical method C; measured: $[M+3]^{3+}$=505.3; calculated: $[M+3]^{3+}$=505.3).

Example 18 Synthesis of Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH* (disulfide C^1-C^7)

Linear peptide synthesis on solid support:

Fmoc-D-Phe-Wang resin (substitution: 0.66mmol/g) was subjected to manual solid phase peptide synthesis via standard Fmoc chemistry. 0.3mmol resin was swelled in DMF for 30 minutes; DMF was drained and the resin was treated with 20% piperidine in DMF for 30 min to remove Fmoc group. The resin was washed by DMF 3 times and coupled with a pre-activated Fmoc amino acid solution (Fmoc amino acid/HBTU/HOBt/NMM=3:3:3:6eq) for 2 hours. Ninhydrin test was performed after each coupling to check the coupling efficiency.

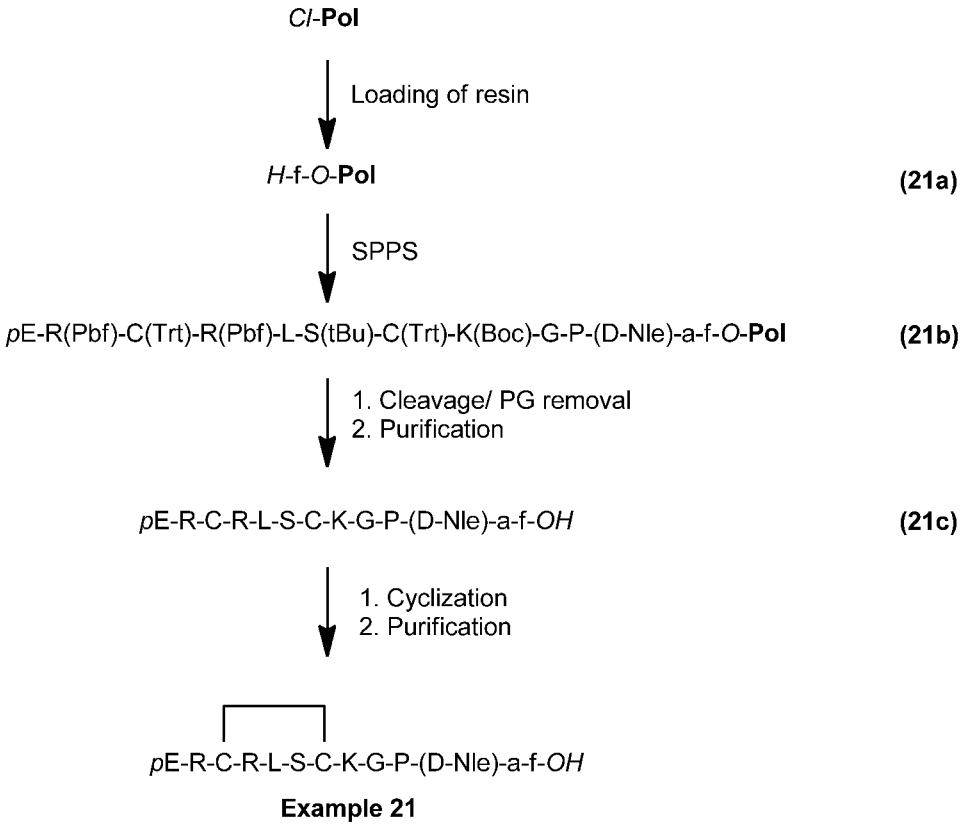
The peptide chain was assembled on resin by repetitive removal of the Fmoc protecting group and coupling of protected amino acid till N-term end.

After the coupling of the last amino acid, peptide resin was washed with DMF and ethyl ether, and dried under vacuum. The dried peptide resin was treated with TFA cleavage cocktail (TFA/thiolanisole/phenol/EDT/H_2O=87.5:5:2.5:2.5:2.5, v/v) for cleavage and removal of the side chain protecting groups. Crude peptides were precipitated from cold ether, collected by filtration and dried under high vacuum. Crude peptides was purified on HPLC (Column: 2"-inch Delta Pak C18 , Wavelength: 215 nm) to afford desired product.

Cyclisation:

Each of crude peptides was dissolved in water-Acetonitrile (A.C.S. reagent, Fisher) at a concentration of 1mg/mL (around 80%:20%; Water: Acetonitrile, V:V), 0.1 M I_2 (A.C.S. reagent, Sigma Aldrich) in 50% AcOH (A.C.S. reagent, Fisher)/H_2O was added drop-wise into the solution with vigorous stirring until I_2 color persist. Upon completion of oxidation (monitored by analytical HPLC and Mass spectroscopy), 1M L-ascorbic acid (A.C.S. reagent, Sigma Aldrich) aqueous solution was drop-wise added with continuous stirring to reduce excess I_2 until the solution becomes colorless. After filtration, the above solution was loaded onto 2-inch C18 column (detection at 215nm), and purified by using TFA buffer (Buffer A, 0.1% TFA (A.C.S. grade, NuGeneration Technology, LLC) in water; Buffer B, 100% acetonitrile), collected fractions with purity of >95% were lyophilized to dry.

Example 21 Synthesis of *p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH* (disulfide C^3-C^7)



Example 21

- Preparation of **Intermediate 21a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-f-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (5.0 g, 8.01 mmol) was reacted with a solution of Fmoc-f-OH (3.10 g, 8.01 mmol) in DCM (50 mL) and DIPEA (5.59 mL, 32.0 mmol) in analogy to the general procedure described above to give **Intermediate 21a** (5.87 g, loading = 0.897 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 21b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 21a (0.100 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on the Liberty ^{TM} microwave peptide synthesizer. Coupling was performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Temperature °C	Microwave power	Synthesis cycle
1	a	1 x 7.5 min	50	20	D
2	D-Nle	1 x 7.5 min	50	20	D
3	P	1 x 7.5 min	50	20	D
4	G	1 x 7.5 min	50	20	D
5	K(Boc)	1 x 7.5 min	50	20	D
6	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
7	S	1 X 7.5 min	50	25	D
8	L	1 x 7.5 min	50	25	D
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
10	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
12	*p*E	1 x 7.5 min	50	25	D

- Preparation of **Intermediate 21c**
  (Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal then purification)

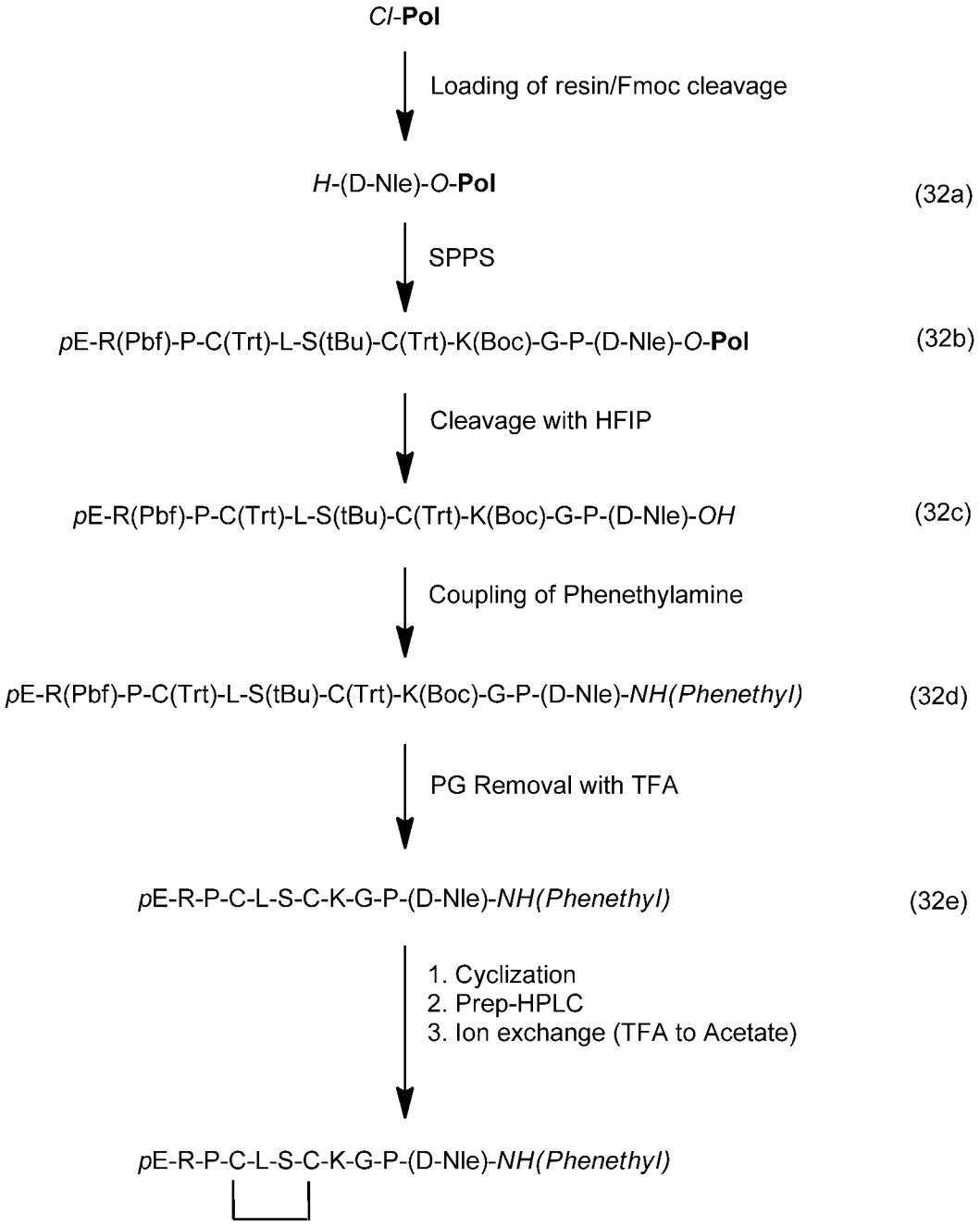
A mixture of 95% aq. TFA/EDT/DTT (95:2.5:2.5) (2 mL) was added to **Intermediate 21b** (0.1 mmol). The suspension was shaken at rt for 2 h, then the cleavage solution was filtered off. The resin was then again treated with 95% aq. TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (2 mL), shaked at rt for 1 h, and filtered. The combined cleavage and washing solutions were poured onto a mixture of cold heptane/diethyl ether (1:1) (11 mL), giving a precipitate. The suspension was centrifuged and the supernatant poured off. Diethyl ether (10mL) was added to the residue, the suspension was vortexed for 3 min and centrifuged, and the supernatant was poured off, The washing process was repeated twice. The solid was dried in high vacuum The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 21c** (55 mg, 0.030 mmol).

- Preparation of **Example 21**
  (Cyclization and Purification)

Intermediate 21c (18 mg, 9.97 μmol) was dissolved in H_2O (1.0 mL). A solution of 50 mM I_2 in AcOH (0.24 mL, 12 μmol) was added in one portion to the stirred solution and the solution was stirred overnight at rt until LCMS showed completion of the reaction. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O (24 μmol, 12 μmol) was added to quench the excess of I_2. The crude was purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford Example 21 as a white solid (12 mg, 6.32 μmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method B; t_R=7.35 min) and UPLC-HRMS (Analytical method D; measured: $[M+2H]^{2+}$=730.355; calculated: $[M+2H]^{2+}$=730.361).

Example 32 Synthesis of *p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)* (disulfide C^4-C^7) Acetate


Cl-**Pol**
Loading of resin/Fmoc cleavage
H-(D-Nle)-*O*-**Pol**
(32a)
SPPS
*p*E-R(Pbf)-P-C(Trt)-L-S(tBu)-C(Trt)-K(Boc)-G-P-(D-Nle)-*O*-**Pol**
(32b)
Cleavage with HFIP
*p*E-R(Pbf)-P-C(Trt)-L-S(tBu)-C(Trt)-K(Boc)-G-P-(D-Nle)-*OH*
(32c)
Coupling of Phenethylamine
*p*E-R(Pbf)-P-C(Trt)-L-S(tBu)-C(Trt)-K(Boc)-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)*
(32d)
PG Removal with TFA
*p*E-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)*
(32e)
1. Cyclization
2. Prep-HPLC
3. Ion exchange (TFA to Acetate)
*p*E-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)*

Example 32

- Preparation of **Intermediate 32a**
  (Loading of 2-chlorotrityl chloride resin with Fmoc-D-Nle-OH, Fmoc removal and determination of the loading of the resin)

2-Chlorotrityl chloride resin (50.0 g, 85.0 mmol) was suspended in of DCM (400 mL) the suspension was stirred for 10 min and then the solvent was drained, the resin was washed with DCM (3 x 200 mL). Then a solution of Fmoc-D-Nle-OH (24.0 g, 68.0 mmol) and DIPEA (96.5 ml, 552.5 mmol) in DCM (120.0 mL) was added to the resin, the suspension was flushed with nitrogen and stirred at rt for 5 min. Another portion of DIPEA (22.7 ml, 127.5 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at rt overnight.

The reaction mixture was drained and the resin was washed with DCM (3 x 250 mL) for 2min each time. The resin was quenched with of a mixture DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15) (2 x 250 mL) for 10 min each time.

The Fmoc group was cleaved by treating the resin with piperidine/DMF (1:3) (1 x 300 mL) for 5 min. the resin was drained then (1 x 300 mL) for 15 min, followed by washing steps: DMF (6 x 250 mL, 2 min each time), isopropanol (2 x 250 mL, 2 min each time) and TBME (6 x 250 mL, 2 min each time). The resin was dried under vacuum at 35°C for 24 hours to afford **Intermediate 32a** (57.8 g, loading = 1.08 mmol/g).

- Preparation of **Intermediate 32b**
  (Assembly of linear peptide)

Intermediate 32a (18.5 g, 20.0 mmol) was subjected to solid phase peptide synthesis on an automatic peptide synthesizer (CSBIO536^{TM}). A coupling cycle was defined as follows:

- Amino acid coupling: AA (3.0 eq.), DIC (3.0 eq.), HOBt (3.0 eq.), DMF (see table below)
- Washing: DMF (4 x 150 mL, 2 min each time).
- Fmoc deprotection: Piperidine/DMF (1:3) (150 mL for 5 min then 150 mL for 15 min).
- Washing: DMF (6 x 150 mL, 2 min each time).

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Coupling Method
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt

2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt

After the assembly of the peptide, the resin was washed with DMF (6 x 150 mL, 2 min each time), isopropanol (6 x 150 mL, 2 min each time) and TBME (6 x 150 mL, 2 min each time). The peptide resin was dried overnight under high vacuum at 35°C to give **Intermediate 32b** (57.6 g, 20.0 mmol).

- Preparation of **Intermediate 32c**
  (HFIP cleavage from the resin)

A portion of **Intermediate 32b** (27 g, 9.37 mmol) was suspended in DCM (300 mL) and stirred for 15 min. The resin was drained then treated with HFIP/DCM (3:7) (3 x 270 mL, 15 min each time). The cleavage solution was filtered off and collected. The resin was washed with DCM (3 x 300 mL). The combined cleavage and washing solutions were concentrated to dryness in vacuo. The white powder was dried overnight under vacuum at 35°C yielding **Intermediate 32c-Batch1** (23.5 g, 9.37 mmol).

The above mentioned procedure was repeated with another portion of **Intermediate 32b** (28.0 g, 9.72 mmol), affording **Intermediate 32c-Batch2** (26.1 g, 9.72 mmol).

- Preparation of **Intermediate 32d**
  (Solution phase coupling of phenethylamine)

Intermediate 32c-Batch2 (20.0 g, 7.44 mmol, 1.0 eq) and HATU (5.23 g, 13.8 mmol, 1.85 eq) were dissolved in DMF (400 mL). A solution of phenethylamine (1.67 g, 13.8 mmol, 1.85 eq) and DIPEA (3.56 g, 27.6 mmol, 3.71 eq) in DMF (60 mL) was added.
The reaction mixture was stirred at rt for 30 min then cooled down to 0°C then brine (460 mL) was added. The suspension was stirred for 10 min then the product was isolated

by filtration. The filter cake was washed with H_2O (300 mL), which was then carefully removed, then dissolved in DCM (300 mL). The solution was dried over MgSO4 then concentrated to dryness in vacuo. The crude product was subjected to flash chromatography over silica gel (eluents: DCM and DCM/iPrOH (8:2)) to afford **Intermediate 32d-Batch1** (14.4 g, 6.6 mmol).

The same procedure was repeated with **Intermediate 32c-Batch1** (23.4 g, 9.37 mmol), excluding the flash chromatography, affording **Intermediate 32d-Batch2** (28.0 g, 9.37 mmol).

- Preparation of **Intermediate 32e**

  (Protecting group removal)

Intermediate 32d-Batch2 (28.0 g, 9.37 mmol) was dissolved in TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2.5:2.5) (290mL) and the reaction stirred at rt for 2 h.

The cleavage solution was filtered off and poured onto cold TBME (3 L) (0-4°C). The turbid suspension was stirred in an ice-water bath for 30 min then filtered through a pore 4 glass filter. The white solid thus obtained was washed with TBME (2 x 100 mL) then dried in vacuum at 35°C overnight to afford **Intermediate 32e-Batch1** (8.9 g, 5.9 mmol).

The same procedure was repeated with **Intermediate 32d-Batch1** (14.4 g, 6.6 mmol) yielding **Intermediate 32e-Batch2** (9.6 g, 6.3 mmol).

- Preparation of **Example 32***)*

1) Cyclization

Intermediate 32e (5.0 g, 3.3 mmol) was dissolved in water (500mL). A solution of iodine (1.18 g, 4.66 mmol, 1.41 eq) in acetic acid (93 mL) was added in one portion. The reaction mixture was stirred at rt for 10 min. A solution of ascorbic acid (1.03 g, 5.83 mmol, 1.77 eq) in water (5.8 mL) was added and the reaction mixture stirred for 10 min, filtered and stored at 4°C until purification.

The same cyclization procedure was repeated until 18.3 g (12.1 mmol) of **Intermediate 32e** had been processed.

2) Purification

The solutions of cyclic peptide were subjected to preparative HPLC in portions of 0.5-5.0 g peptide per injection. The fractions having purity higher than 95% were pooled and freeze dried to yield a total amount of 4.89 g (3.2 mmol) of purified peptide (TFA salt) was produced.

3) Acetate formation by ion exchange

75 g (100 mL) of a strong anion exchanger resin (Ion exchanger III, Merck) in its OH^- form was placed in sintered glass filter (porosity 3) and then a solution of acetic acid/water (1:3) (300 mL) was added, the suspension was manually stirred for 2 min then the resin was drained. The process was repeated with another portion of acetic acid/water (1:3) (300 mL). The resin was washed with deionized water until a neutral drain was observed. Then the resin was transferred to a 4 x 20 cm column equipped with a sintered glass filter (porosity 3).

4.8 g of purified peptide was dissolved in deionized water (50 mL) and added to the column. The product was eluted with deionized water (200 mL). Control of product elution was done by TLC spotting, the rich fractions were pooled and freeze dried to give **Example 32** (4.1 g, 2.9 mmol).

The pure product was analyzed by analytical HPLC (Analytical method B; t_R=8.01 min) and UPLC-HRMS (Analytical method D; measured: $[M+2H]^{2+}$=643.328; calculated: $[M+2H]^{2+}$=643.324). The acetate content was 7.99-8.27 % and the water content was 1.94-1.96 %.

The other examples were synthesized in analogy:

- **Examples 1** to **8**, **10**, **11, 13** to **17, 20, 28** to **31** were synthesized in analogy to **Example 12**.
- **Examples 19, 26, 27**, **36-38** were synthesized in analogy to **Example 18**.
- **Examples 22-25**, **33-35** were synthesized in analogy to **Example 21**.

Bioconjugate examples:

Example 39: Albumin-PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Phenethylamine* wherein wherein PPA is 3-(pyridin-2-yldisulfanyl)propanoic acid

Step 1: Albumin decapping

- Decapping with TCEP

To a solution of albumin (500 mg, Aldrich, lyophilized powder, from human serum) in 10 mL of PBS 1x buffer in a 15 mL tube was added a solution of TCEP hydrochloride (1.074 mg in bio-grade purified water) once. The resultant solution was shaked at rt for 1 hr, then desalted and washed with two Amicon Ultra-4 centrifugal filters (30K MWCO). The filters were spinned at 4K g for 40 mins and the filtrates were discarded. 3 mL of bio-grade purified water was added to each filter for each wash (spinned at 14K g for 10 mins) and the wash process was repeated 3 times. The decapped HSA was dissolved in water (~20 mL in total). The solution was transffered to a 50 mL Falcon tube, and lyophilized to give a crystalline powder (500mg).

The pure product was analyzed by UPLC-MS (Analytical method F; measured: 66439.0; expected: 66437).

- Determination of the number of free thiol group in decapped HSA

To a solution of this decapped HSA (2 mg) in 400 μL of PBS pH 7.4 in a 2 mL tube was added a solution of 6-maleimidohexanoic acid (13 μg) in water. The resultant solution was shaked at rt for 2 hr. UPLC-MS (Analytical method G) showed mono-adduct formation only, measured: 66649.0; expected: 66648.

- Decapping with DTT

To a solution of albumin (400 mg, Aldrich, lyophilized powder, from human serum) in 5 mL of PBS 1x buffer in a 15 mL tube was added a solution of DTT (0.232 μl, 2mg/mL in bio-grade purified water) once. The resultant solution was shaked at rt for 2 hr, then desalted and washed with twenty Amicon Ultra-0.5 centrifugal filters (10K MWCO). The filters were spinned at 14K g for 10 mins and the filtrates were discarded. Bio-grade purified water was added to the top of each filter for each wash (spinned at 14K g for 10 mins) and the wash process was repeated 6 times. The decapped HSA was dissolved in water (~20 mL in total). The solution was transffered to a 50 mL Falcon tube, and lyophilzed to give a crystalline powder (376 mg).

The pure product was analyzed by UPLC-MS (Analytical method G; measured: 66438.5; expected: 66437).

- Determination of the number of free thiol group in decapped HSA

To a solution of this decapped HSA (3 mg) in 400 μL of PBS pH 7.4 in a 2 mL tube was

added a solution of 3-maleimidopropionic acid (25 μg) in water. The resultant solution was shaked at rt overnight. UPLC-MS (Analytical method G) showed mono-adduct formation only, measured: 66608.0; expected: 66606.

- Decapping with Cysteine

To a solution of albumin (120 mg, Aldrich, lyophilized powder, from human serum) in 1 mL of 50 mM PBS buffer pH 8.0 in a 2 mL tube was added cysteine (10.94 mg) once. The resultant solution was shaked at rt for 1 hr, then desalted and washed with two Amicon Ultra-0.5 centrifugal filters (10K MWCO). The filters were spinned at 14K g for 10 mins and the filtrates were discarded. Bio-grade purified water was added to the top of each filter for each wash (spinned at 14K g for 10 min) and the wash process was repeated 5 times. The decapped HSA was dissolved in water (4 mL in total). The solution was transffered to a 15 mL Falcon tube, and lyophilized to give a crystalline powder (108 mg).

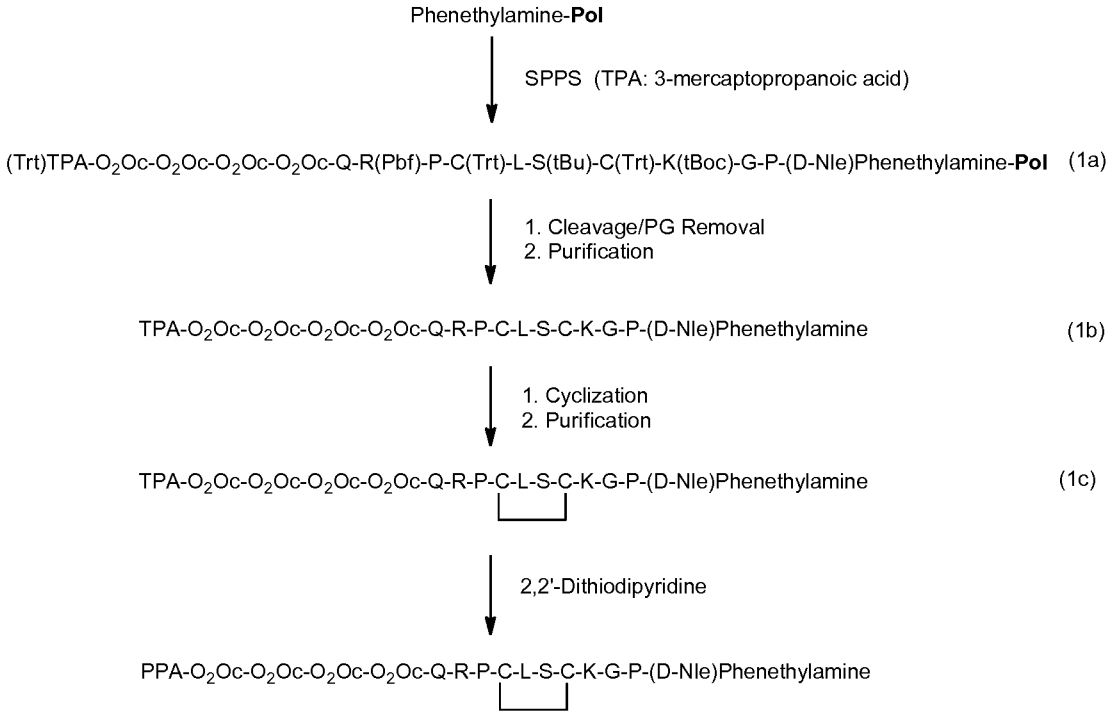
The pure product was analyzed by UPLC-MS (Analytical method G; measured: 66439; expected: 66437).

- Determination of the number of free thiol group in decapped HSA

To a solution of this decapped HSA (3 mg) in 500 μL of PBS pH 7.4 in a 2 mL tube was added a solution of 3-maleimidopropionic acid (15 μg) in water. The resultant solution was shaked at rt for 1hr. UPLC-MS (Analytical method G) showed mono-adduct formation only, measured: 66608.0; expected: 66606.

Step 2:

Synthesis of Peptide-Linker Construct 1: PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)*Phenethylamine* wherein PPA is 3-(pyridin-2-yldisulfanyl)propanoic acid



Peptide-Linker Construct 1

- Preparation of **Intermediate 1a**
  (Assembly of linear peptide) O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Phenethylamine*
- Phenethylamine-AMEBA resin (Aldrich, 0.25 mmol) is subjected to solid phase peptide synthesis on the Liberty ™ microwave peptide synthesizer. Coupling is performed as follows:

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Temperature °C	Microwave power
1	D-Nle	1 x 7.5 min	50	20
2	P	1 x 7.5 min	50	20
3	G	1 x 7.5 min	50	20
4	K(tBoc)	1 x 7.5 min	50	20
5	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25

6	S(tBu)	1 x 7.5 min	50	20
7	L	1 x 7.5 min	50	25
8	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
9	P	1 x 7.5 min	50	25
10	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0
		2 x 7.5 min	50	25
11	Q(Trt)	1 x 7.5 min	50	25
12	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
13	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
14	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
15	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
16	TPA(Trt)	1 x 7.5 min	50	25

- Preparation of **Intermediate 1b**

(Cleavage from the resin with concomitant protecting group removal then purification)

A solution made of 1.54 g of DTT and 0.75 mL of thioanisole in 6 mL of TFA/TIPS/Water (95:2.5:2.5) is added to **Intermediate 1a** (0.25 mmol) and the suspension is shaken at rt for 5 hr. The cleavage solution is filtered off and the resin is washed with 95% aq. TFA. The combined cleavage and washing solutions are poured onto cold diethyl ether, giving a precipitate. The suspension is centrifuged and the supernatant poured off. Diethyl ether is added to the residue, the suspension is vortexed for 3 min, centrifuged, and the supernatant is poured off. The washing process is repeated 3 times. The solid is dried in high vacuum. The crude is purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 1b**.

- Preparation of **Intermediate 1c**

(Cyclization and purification

Intermediate 1b is dissolved in H_2O (2.0 mL). A solution of 50 mM I_2 in AcOH (1.3 eq) is added in one portion to the stirred solution and the solution is stirred overnight at rt and LC/MS shows completion of the reaction. 0.5 M Ascorbic acid in H_2O is added to quench the excess of I_2. The crude is purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Intermediate 1c.**

- Preparation of Peptide-Linker Construct 1**Intermediate 1c**

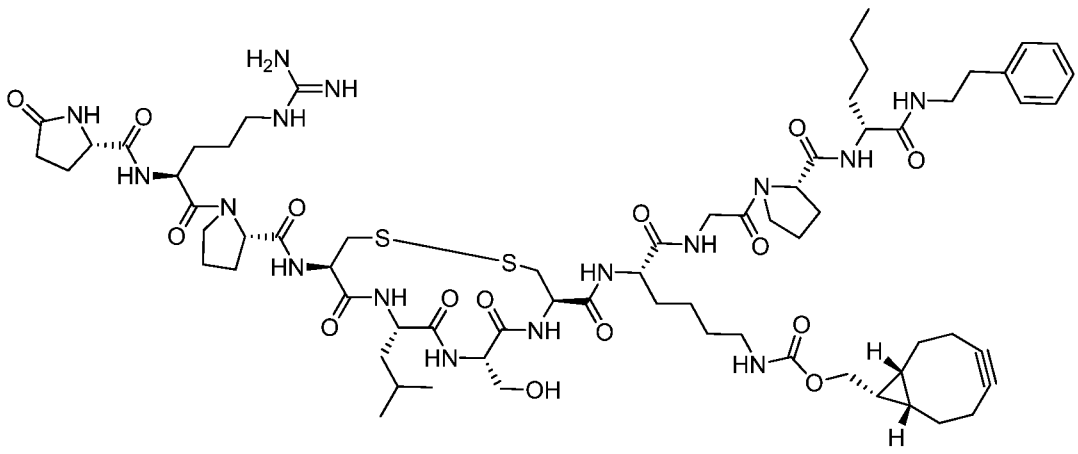
A mixture of **Intermediate 1c**, 2,2'-dithiodipyridine (3eq) in ACN is shaked at 25 °C for 1 hr. The reaction mixture is diluted with MeOH and filtered. The solution is purified by preparative HPLC and lyophilized from ACN/H_2O to afford **Peptide-Linker Construct 1**.

Step 3: Peptide-linker construct/ Albumin conjugation

A solution of decapped HSA (100 mg) in PBS buffer (6 mL) is treated with a solution of PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-*(D-Nle)Phenethylamine* (2 eq in water). The resultant solution is shaked at rt for 1 hr, then desalted and washed with 4 Amicon Ultra-0.5 centrifugal filters (10K MWCO). The filters are spinned at 13K g for 10 mins and the filtrates are discarded. Bio-grade purified water is added to the top of each filter for each wash (spinned at 13K g for 10 mins) and the wash process is repeated 6 times. The conjugate is dissolved in water (4 mL in total). The solution is transffered to a 15 mL Falcon tube, and lyophilized to give **Example 39**.

Example 40: Apelin cyclic peptide conjugated to a fatty acid via a BCN-PEG linker:

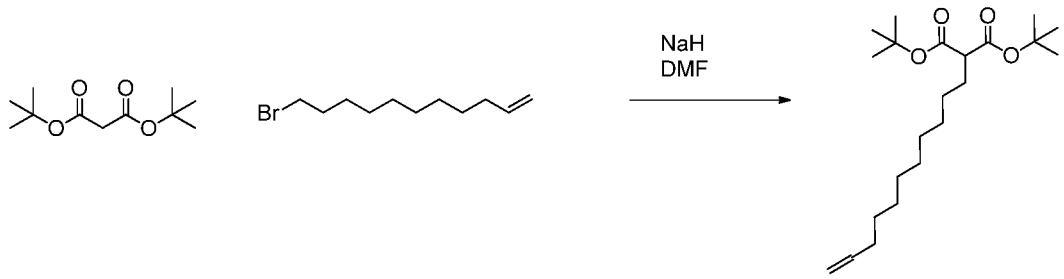
Step 1: Preparation of Apelin cyclic peptide-BCN construct: Preparation of pE-R-P-C*-L-S-CP-N^6-[[(1α,8α,9α)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy]carbonyl]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenethyl) [disulfide C4-C7]



A mixture of pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenethyl) triacetate [disulfide C4-C7] (Example 32: 100 mg, 0.068 mmol), sodium bicarbonate (38 mg, 0.452 mmol) and water (83

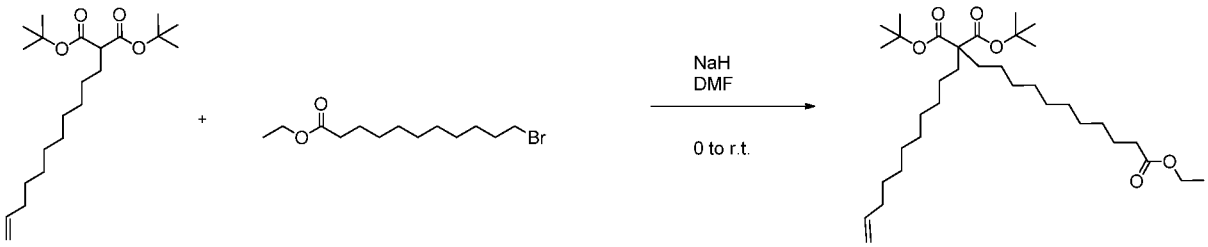
uL) in DMF (1 mL) was stirred at RT for 10 mins, then (1R,8S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl succinimidyl carbonate (Berry &associates, 20 mg, 0.068 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at RT for 90 mins. 1 mL of water was added to the mixture, and the resultant solution was lyophilized to give a powder which was used for the next step without further purification.

Step 2: Di-tert-butyl 2-(undec-10-yn-1-yl)malonate



Di-tert-butyl malonate (800 mg, 3.70 mmol) is dissolved in DMF (9 mL) at 0°C under N_2 and NaH (148 mg, 3.70 mmol) is added. The reaction is stirred 30 minutes at 0°C and 11-bromo-dec-1-ene (3.33 mmol) is added slowly dropwise, resulting in a yellow solution. The reaction is stirred at 0°C for 2 hours then warmed to r.t. and stirred for 16 hours. The mixture is taken up in EtOAc (75 mL) and washed with H_2O (25 mL). The aqueous layer is extracted with EtOAc (75 mL) and the combined organic layers are dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The mixture is purified via flash column (12 g silica cartridge, 0-20% EtOAc/heptanes) and fractions are concentrated to yield the desired product.

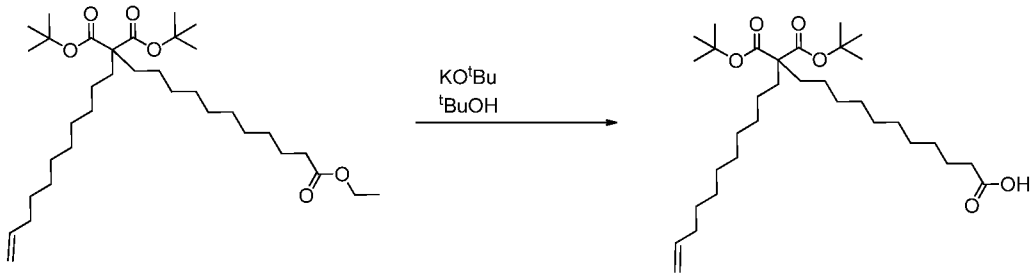
Step 3: 11,11-di-tert-butyl 1-ethyl docos-21-ene-1,11,11-tricarboxylate



Compound from step 2 (0.442 mmol) is dissolved in DMF (2 mL) at 0°C and NaH (21.23 mg, 0.531 mmol) is added. The reaction stirred at 0°C for 15 minutes and ethyl 11-bromoundecanoate (143 mg, 0.486 mmol) is added slowly dropwise. The reaction is warmed to r.t. and stirred for 16 hours. The mixture is diluted with EtOAc (40 mL) and washed once with H_2O (20 mL). The aqueous layer is extracted once with EtOAc (40 mL)

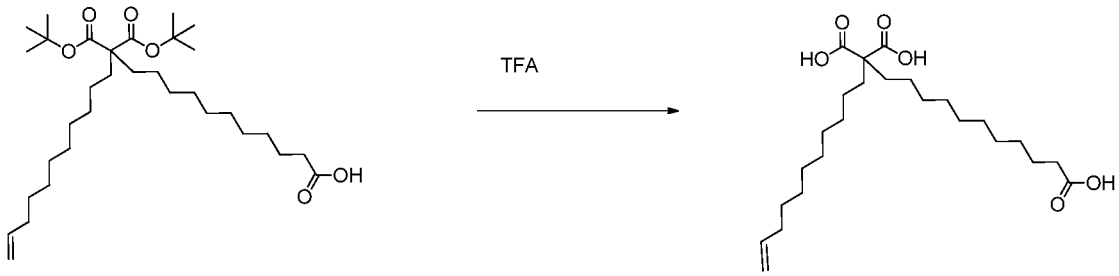
and the organic layers are combined, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The sample is dissolved in 1 mL DCM and purified via flash column (12 g silica column, 0-20% EtOAc/heptane, 15 min). The fractions are combined and concentrated to give the desired product.

Step 4: 12,12-bis(tert-butoxycarbonyl)tricos-22-enoic acid



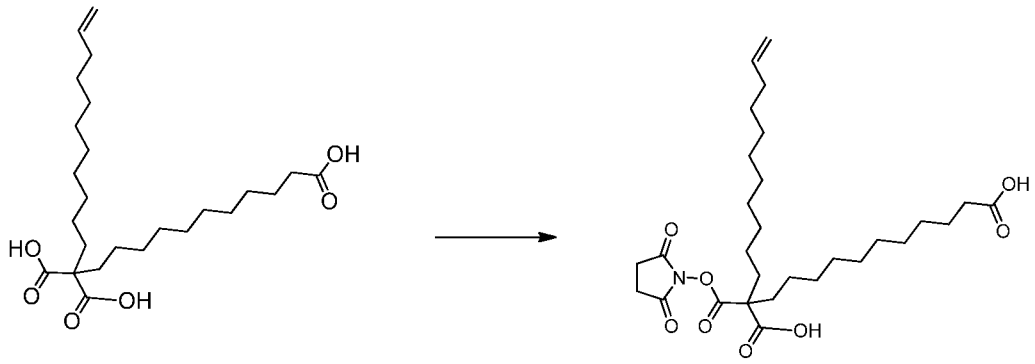
To a solution of compound from step 3 (0.037 mmol) in ^{t}BuOH (1 mL) is added a solution of KOtBu (114 mg, 1.012 mmol) in ^{t}BuOH (2 mL) at 30°C under N_2. The mixture is stirred at r.t. and monitored by TLC (1:1 EtOAc/hexanes, $KMnO_4$, reflux). After the reaction is completed, the reaction mixture is quenched with 1 M HCl (20 mL) and extracted twice with EtOAc (25 mL). The organic layers are combined, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The material was carried on to the next step without further purification.

Step 5: Docos-21-ene-1,11,11-tricarboxylic acid



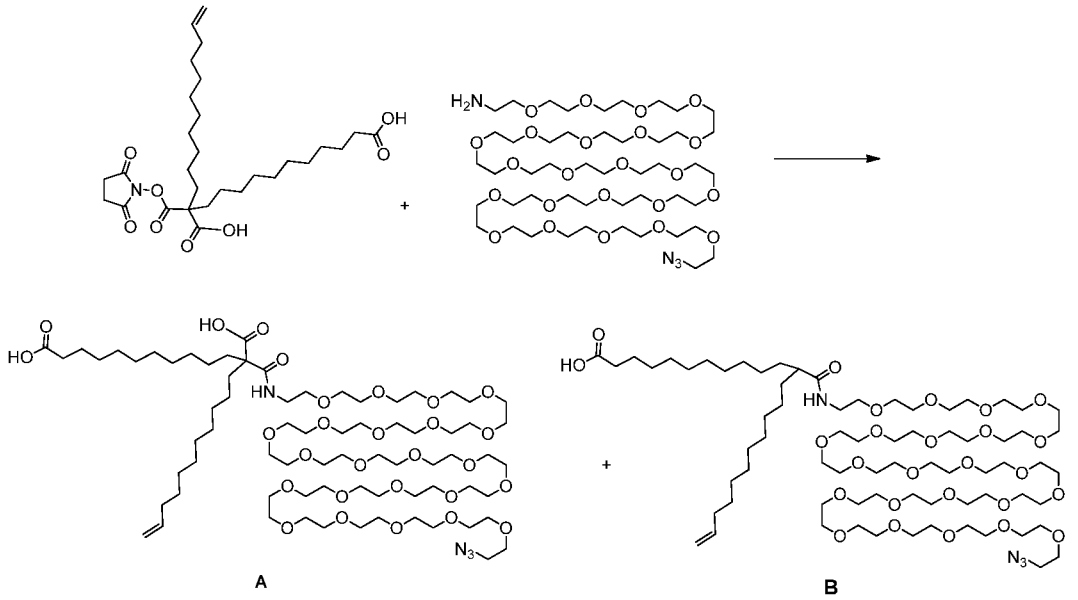
TFA (2 mL) is added to a compound from step 4 (0.022 mmol) and the reaction is stirred at r.t. for 1 hour. The mixture is diluted with DCM (10 mL) and concentrated. The material is taken up in EtOAc (10 mL) and washed with H_2O (20 mL). The organic layer is dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated. The crude material is dissolved in 1 mL MeOH and purified via MS-triggered HPLC (Sunfire 30x50mm 5um column ACN/H_2O w/ 0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml injection, 45-70% ACN over 3.5 min).

Step 6: 2-(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-(undec-10-en-1-yl)tridecanedioic acid



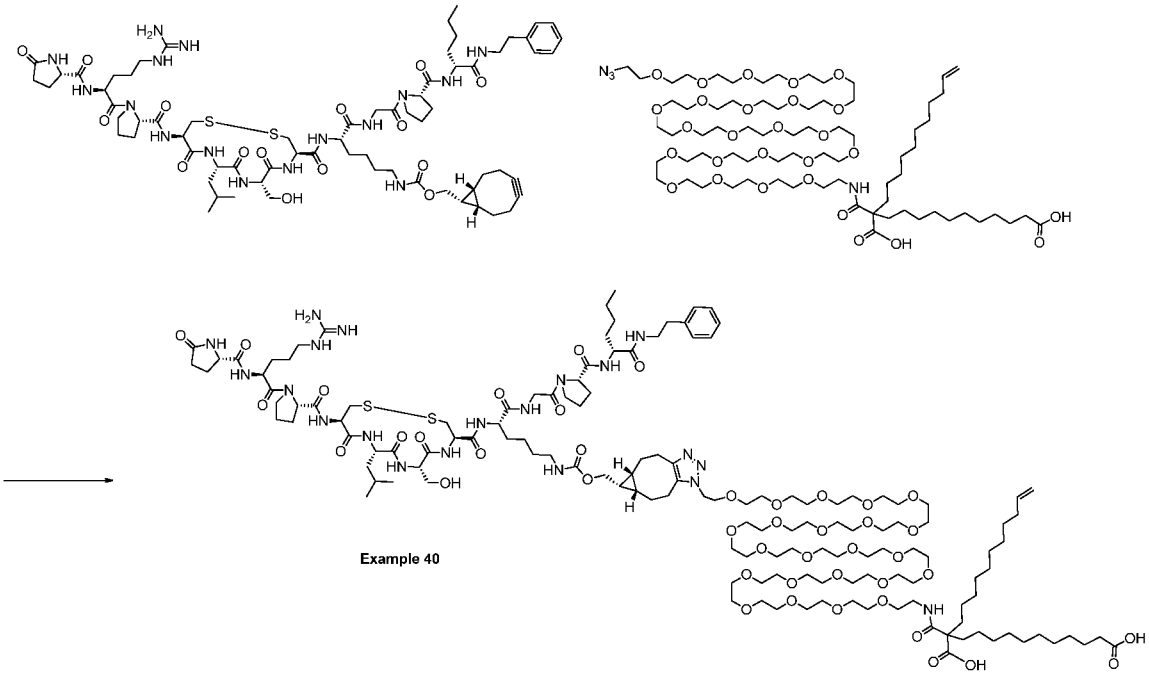
DCC (187mg, 0.908mmol) in DCM (2mL) was added to a solution of N-hydroxysuccinimide (99mg, 0.862mmol) and docos-21-ene-1,11,11-tricarboxylic acid (Intermediate 45: 400mg, 0.908mmol) in DCM (7mL) and THF (0.7mL). The reaction was stirred overnight before the solvent was evaporated. The residue was purified by HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 55-80% ACN / water +0.1% TFA) to yield the title compound (155mg, 0.288mmol, 32%): by LCMS Method E Rt = 1.51min, M+H 538.3; ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.16 - 1.46 (m, 28 H) 1.60 - 1.87 (m, 3 H) 1.91 - 2.17 (m, 5 H) 2.38 (t, *J*=7.03 Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd, *J*=11.25, 7.34 Hz, 1 H) 3.78 (dd, *J*=11.31, 5.20 Hz, 1 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H).

Step 7: fatty acid-PEG linker



Azido-dPEG23-amine (Quanta Biodesign: 164mg, 0.149mmol) and compound from step 6 (80mg, 0.149mmol) were dissolved in THF (2.5mL). DIPEA (39μL, 0.233mmol) was added and the reaction agitated overnight. The solvent was evaporated and the residue purified by HPLC (Sunfire C18 30x50mm; 45-70% ACN/water +0.1% TFA) to yield compounds A (97mg, 0.061mmol, 41%) and B (32mg, 0.021mmol, 14%): LCMS ZQ1 Method E Rt = 1.35min, $[M+2H]^{+2}$ 761.9; ^{1}H NMR (400 MHz, ACETONITRILE-*d*3) δ ppm 1.05 - 1.18 (m, 3 H) 1.19 - 1.32 (m, 20 H) 1.36 (t, *J*=7.15 Hz, 1 H) 1.48 - 1.59 (m, 2 H) 1.65 - 1.75 (m, 2 H) 2.01 - 2.06 (m, 2 H) 2.25 (t, *J*=7.46 Hz, 2 H) 3.33 - 3.39 (m, 2 H) 3.39 - 3.44 (m, 2 H) 3.50 - 3.67 (m, 98 H) 4.84 - 4.95 (m, 1 H) 4.95 - 5.06 (m, 1 H) 5.83 (ddt, *J*=17.07, 10.29, 6.68, 6.68 Hz, 1 H) 7.31 (t, *J*=5.44 Hz, 1 H); LCMS method E Rt = 1.50min, $[M+2H]^{+2}$ 739.9; ^{1}H NMR (400 MHz, ACETONITRILE-*d*3) ppm 1.16 - 1.42 (m, 30 H) 1.42 - 1.63 (m, 5 H) 2.00 - 2.07 (m, 2 H) 2.22 - 2.28 (m, 2 H) 2.40 - 2.52 (m, 2 H) 3.25 - 3.33 (m, 2 H) 3.33 - 3.42 (m, 2 H) 3.42 - 3.50 (m, 2 H) 3.50 - 3.68 (m, 88 H) 4.86 - 5.06 (m, 2 H) 5.83 (ddt, *J*=17.04, 10.26, 6.71, 6.71 Hz, 1 H) 6.40 - 6.74 (m, 1 H).

Step 8: Preparation of Example 40:



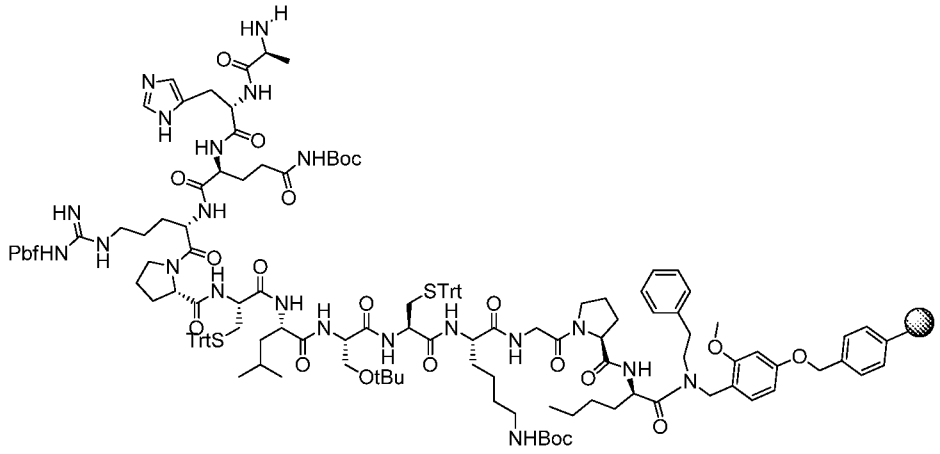
Example 40

A mixture of pE-R-P-C*-L-S-C*-N^6-[[(1α,8α,9α)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy]carbonyl]-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenethyl) [disulfide C4-C7] (50 mg of the product from step 1 in 1 mL of water, 0.034 mmol) and compound A from step 7(52 mg, in 268 uL of water) was stirred at

RT for about 3 hrs. The reaction mixture was then purified by preparative HPLC (Sunfire 30x50mm 5um column ACN/H2O w/ 0.1% TFA 75ml/min, 15-40% ACN 5 min gradient). The product fraction was lyophilized to give the titled product as TFA salt (24 mg, 21%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50°C, Eluent A: Water + 0.1% Formic Acid, Eluent B: Acetonitrile + 0.1% Formic Acid, gradient 2% to 98% B/A over 5.15 mins): Rentention time: 2.77 mins; MS $[M+2]^{2+}$: observed: 1491.8808, calculated: 1491.8560.

Example 41: Apelin cyclic peptide conjugate to a fatty acid at the N-terminus

Step 1: Synthesis of A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Phenethyl amine **Intermediate 41a**



Phenethylamine-AMEBA resin (Sigma Aldrich, 0.1 mmol, 1.0 mmol/g) was subjected to solid phase peptide synthesis on an automatic peptide synthesizer (CEM Liberty Blue Microwave) with standard double Arg for the Arg residues and DNle coupled double time. Amino acids were prepared as 0.2 M solutions in DMF. A standard coupling cycle was defined as follows:

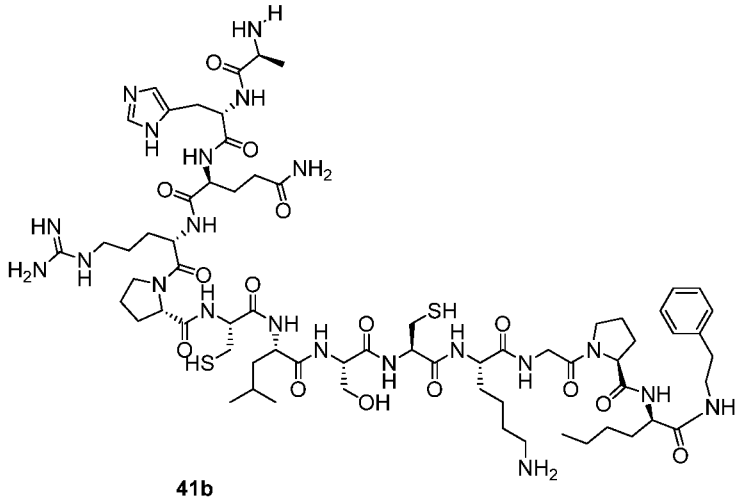
- Amino acid coupling: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Washing: DMF (3 X 7 mL)
- Fmoc Deprotection: 20% Piperidine/0.1 M HOBt (2 x 7 mL)
- Washing: DMF (4 x 7 mL then 1 x 5 mL)

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time (Temp)	Coupling Method
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

	OH		
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

After the assembly of the peptide, the resin was washed with DMF (2 x 50 mL) and DCM (2 x 50 mL) then dried under vacuum to give **Intermediate 41a** (276 mg, 0.1 mmol).

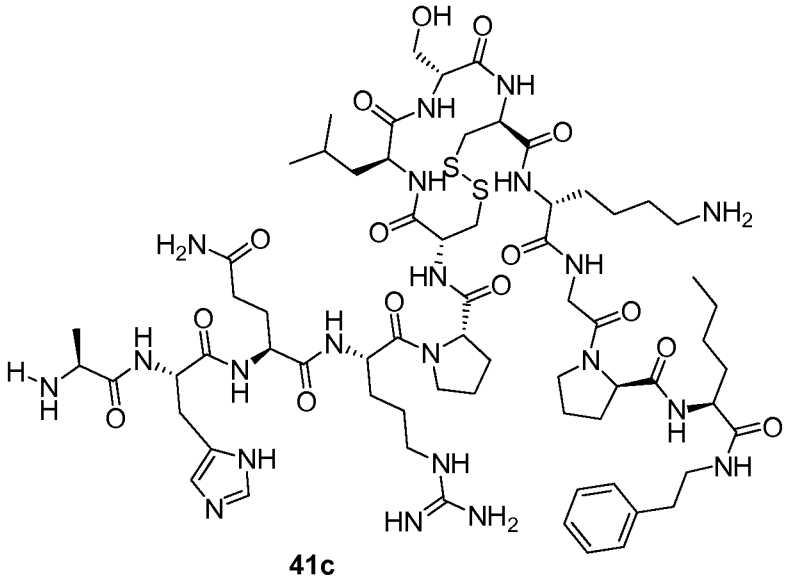
Step 2: Preparation of **Intermediate 41b** *(Cleavage of peptide from resin)*



41b

Intermediate 41a (276 mg, 0.1 mmol) was combined with 4 mL TFA solution (37 mL TFA, 1 mL H_2O, 1 mL TIPS, 3.06 g DTT) and shaken at r.t. for 3 hours. The solution was removed from the resin and precipitated into 40 mL cold Et_2O. The solution was vortexed and let stand over ice for 10 minutes before centrifuging at 4000 rpm for 5 minutes. The solvent was removed and the white solid was washed twice more with cold Et_2O (40 mL each time), centrifuged (5 minutes each time) and decanted. The solid was dried under vacuum overnight yielding **Intermediate 41b-batch 1** (17.4 mg, 0.012 mmol). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18 column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 1.83 minutes, MS [M+H] 1513.5.

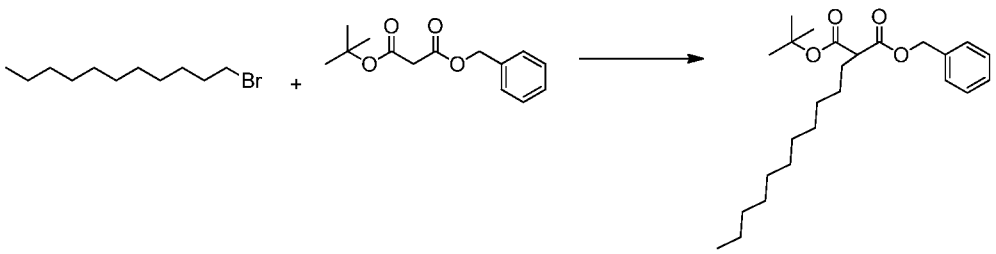
Step 3: Preparation of **Intermediate 41c** *(Cyclization of cysteine residues)*



41c

Intermediate 41b-batch1 and 2 (29.6 mg, 0.020 mmol) was dissolved in water (3 mL) and 10 drops of DMSO to give a slightly cloudy solution. Iodine (50 mM in HOAc, 0.783 mL, 0.039 mmol) was added slowly dropwise and the reaction was mixed at r.t. overnight. LCMS analysis of the crude reaction showed complete conversion of starting material. 0.5 M ascorbic acid was added dropwise until color dissipated. The material was purified via MS-triggered HPLC. Lyophilization of the pooled fractions gave 7 mg of the desired product as a white powder (4.63 µmol, 24%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide, Acquity UPLC BEH C18 column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 0.90 minutes, MS [M+H] 1511.8.

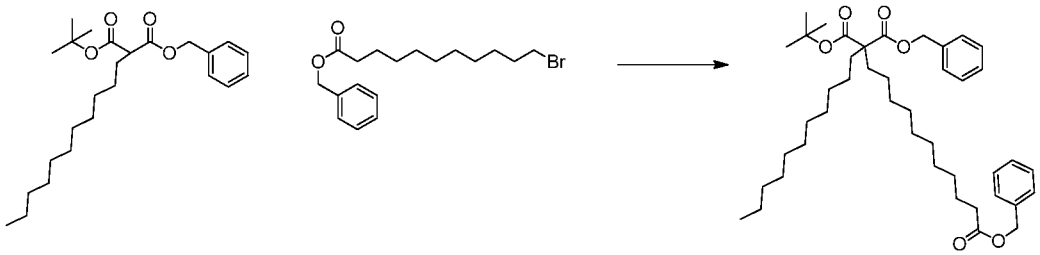
Step 4: 1-Benzyl 3-tert-butyl 2-undecylmalonate



To a suspension of NaH (160mg, 4.0mmol) in DMF (8mL) at 0°C under N_2, was added benzyl tert-butyl malonate (1.0g, 4.0mmol) in DMF (2mL). The mixture was stirred for 50min after

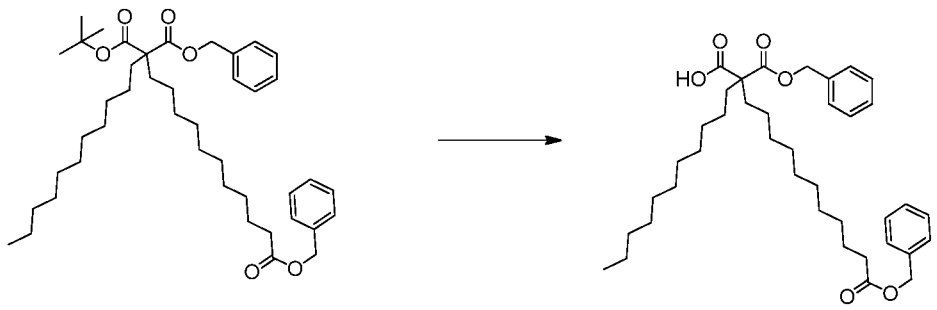
which 1-bromoundecane in DMF (2mL) was added. After an additional hour of stirring the reaction was allowed to warm to room temperature. The reaction was maintained overnight. Et_2O (100mL) and water (20mL) were added to partition the reaction. The aqueous phase was extracted with Et_2O (100mL), and the combined organics dried over Na_2SO_4. The solvent was evaporated and the residue purified by flash column (C18 12g, 40-100% ACN / water +0.1% TFA) to yield the title compound as a colorless oil (1.14g, 2.82mmol, 71%): LCMS Method F Rt = 1.58min, M+Na 427.4; ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.84 - 0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, *J*=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, *J*=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, *J*=12.27 Hz, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 5 H).

Step 5: 1,11-Dibenzyl 11-tert-butyl docosane-1,11,11-tricarboxylate



The title compound was synthesized in a fashion similar to step 3 of Example 40 using compound from step 4 (177mg, 0.284mmol) as a starting material to yield a colorless oil (153mg, 0.213mmol, 75%): ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

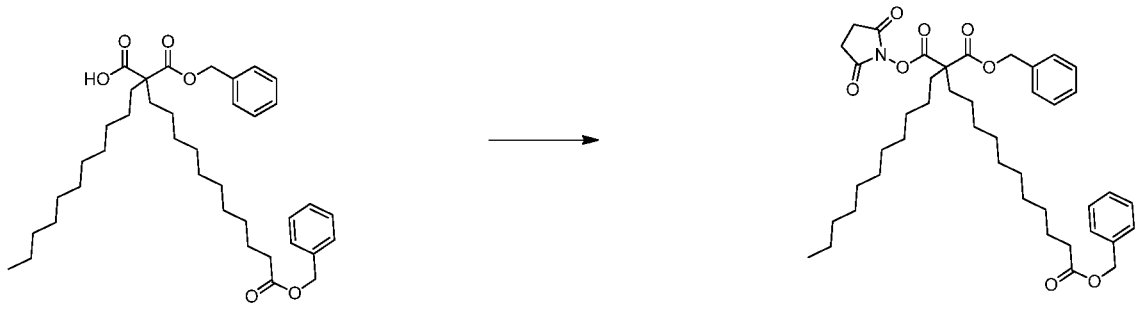
Step 6: 13-(Benzyloxy)-2-((benzyloxy)carbonyl)-13-oxo-2-undecyltridecanoic acid



To a solution of a compound from step 5 (200mg, 0.295mmol) in DCM (3mL) was added TFA (0.6mL), and the reaction stirred at room temperature for 3hrs. The solvent was evaporated

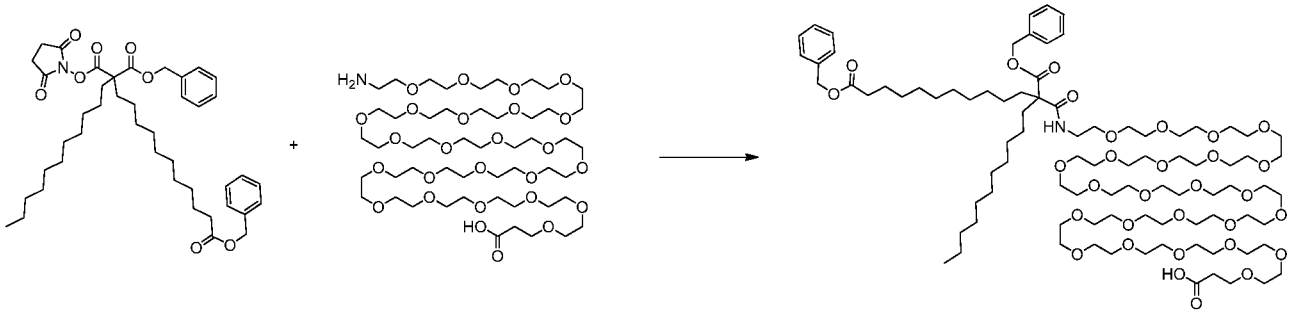
and the residue purified by flash column (silica 12g, 0-15% EtOAc / HEP) to yield the title compound (177mg, 0.284mmol, 96%): ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H).

Step 7: 1,11-Dibenzyl 11-(2,5-dioxocyclopentyl) docosane-1,11,11-tricarboxylate



The title compound was synthesized in a fashion similar to step 6 of Example 40 using compound from step 6 (177mg, 0.284mmol) as a starting material to yield a colorless oil (153mg, 0.213mmol, 75%): ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H).

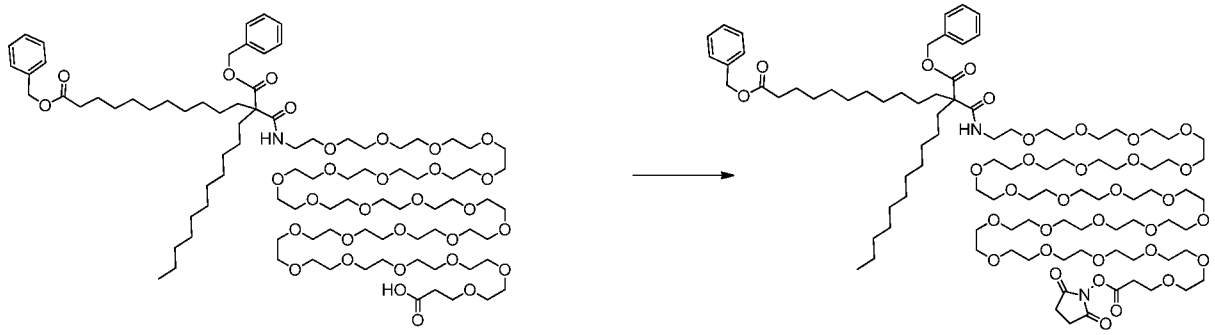
Step 8:



A solution of intermediate **34** (145mg, 0.201mmol) in THF (1.5mL) and DCM (1.5mL) was added to a vial charged with amino-PEG24-acid. DIPEA (88μL, 0.504mmol) was added and the reaction agitated on a shaker plate for 15hrs. The solvent was evaporated and the

residue purified by supercritical fluid chromatography (Waters HILIC 20x150mm; 15-25% MeOH / CO_2) to yield intermediate **35** (151mg, 0.086mmol, 43%): LCMS Method E Rt = 1.30min, [M+2H]+2 876.4; ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 0.93 - 1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23 - 1.37 (m, 15 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 2 H) 3.59 - 3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H).

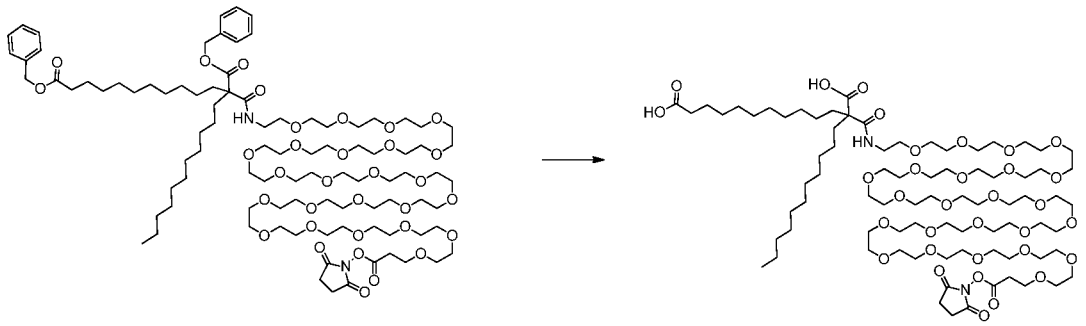
Step 9:



DCC (22mg, 0.103mmol) in DCM (0.265mL) was added to a solution of intermediate **35** (150mg, 0.086mmol) and N-hydroxysuccinimide in DCM (1.5mL). The reaction was stirred for 1.5hrs. Additional N-hydroxysuccinimide (10mg) in THF (0.5mL) and DCC (22mg) in DCM (0.265mL) was added and the reaction stirred overnight. The solvent was evaporated and the residue purified by flash column (silica 12, 0-5% MeOH / DCM) to yield intermediate **36** (159mg, quantitative) as a white solid: LCMS Method G Rt = 1.55min, $[M+H_3O+H]^{+2}$ 933.9

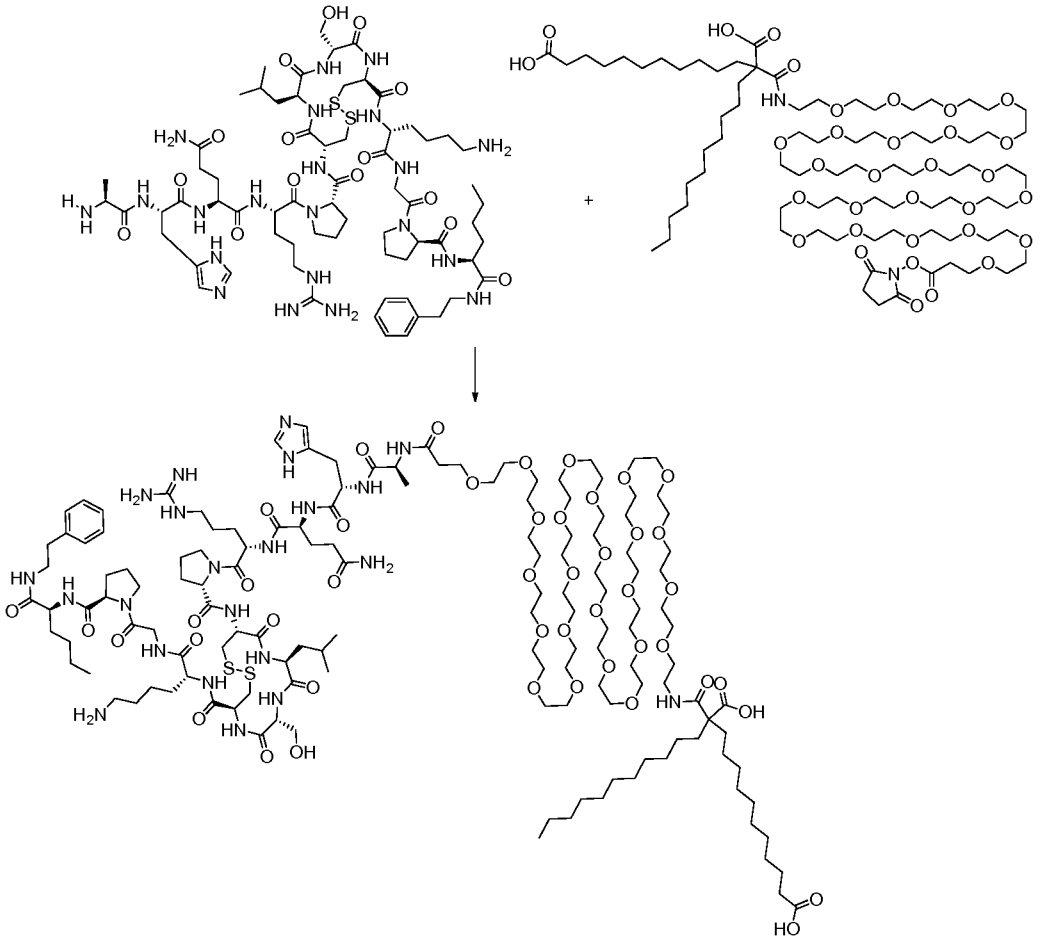
.

Step 10:



To a solution of compound from step 9 (159mg, 0.086mmol) in THF (5mL) was added a suspension of 10% Pd on carbon (4.6mg, 4.3 mol) in THF (1mL). The reaction was placed under hydrogen and stirred for 40min. More Pd on carbon (7mg, 6.5μmol) was added and the stirred another 1hr under hydrogen. The reaction was passed through a membrane filter and the filtrate evaporated. The residue was purified by HPLC (Sunfire C18 30x50mm, 45-70% ACN / water + 0.1% TFA) to yield the title compound (83mg, 0.047mmol, 54%): LCMS Method G Rt = 1.03min, [M+2H]+2 835.2; ^{1}H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) ppm 0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21 - 1.39 (m, 30 H) 1.57 - 1.68 (m, 2 H) 1.69 - 1.80 (m, 2 H) 1.97 - 2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 3.51 - 3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, *J*=6.48 Hz, 2 H) 7.45 (t, *J*=4.46 Hz, 1 H)

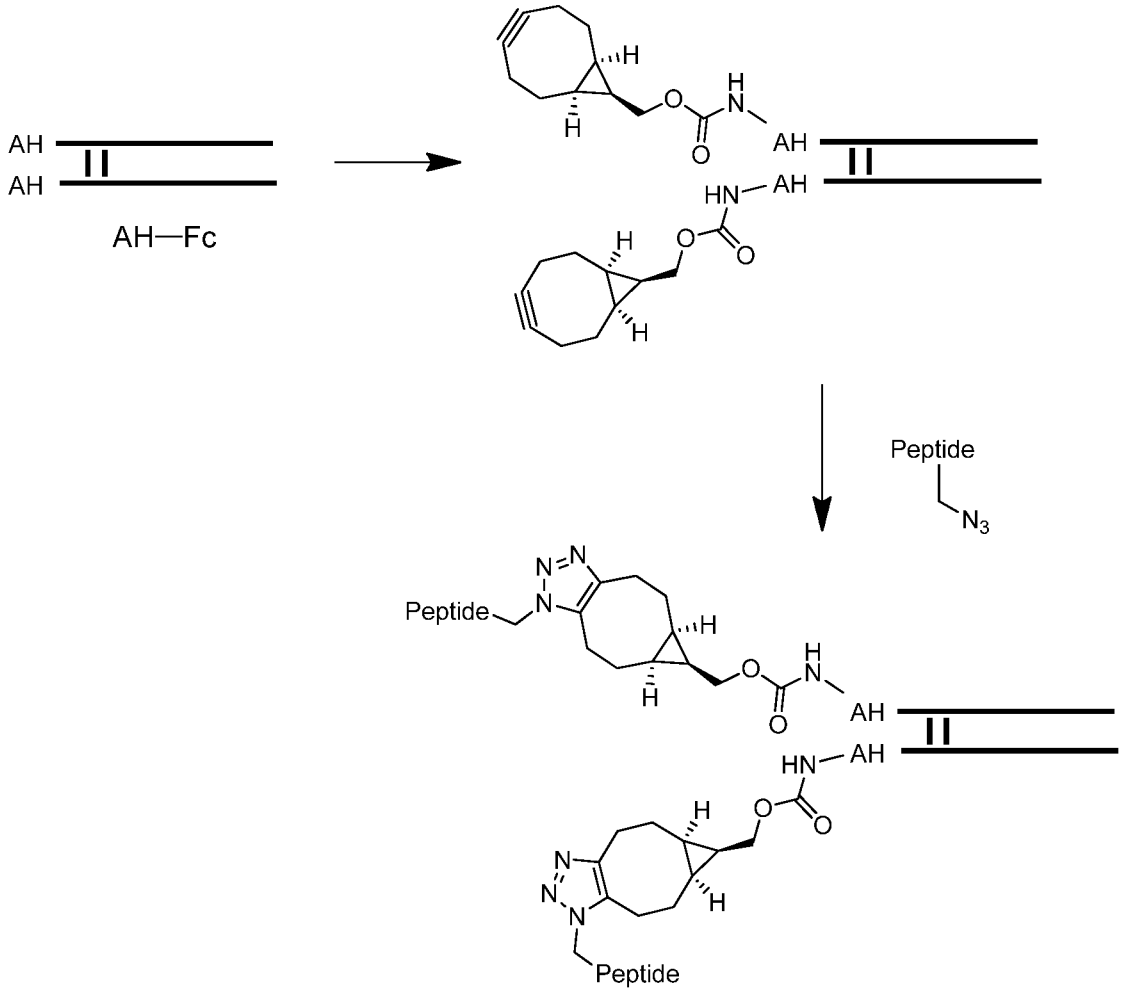
Step 4: Preparation of conjugate comprising Apelin construct A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-Phenethyl amine and fatty acid-PEG construct (N-terminus conjugation)- Example 41



A 10 mg/mL solution of NHS-fatty acid (product A from step 7 of Example 40) was prepared in H_2O. **Intermediate 41c** (1.5 mg, 0.993 µmol) was dissolved in 30 mM pH4 NaOAc buffer (672 µL) and NHS-fatty acid (0.850 mL, 5.10 µmol) was added. The reaction was mixed at r.t. for 16 hours at which point an additional 1.5 mg of NHS-fatty acid (10 mg/mL in H_2O) was added and the reaction mixed at r.t. for 16 hours. 8 mg of NHS-fatty acid (10 mg/mL in H_2O) was added and the reaction mixed at r.t. for 3 days and 1.7 mg of NHS-fatty acid (10 mg/mL in H_2O) was added. The mixture was shaken at r.t. for 16 hours and purified via M-triggered HPLC to give 1.7 mg of the title compound as a white powder (0.510 µmol, 51%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18 column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 3.87 minutes, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9.

Example 42: Conjugation of AH-Fc with apelin cyclic peptide

General Scheme



Step 1: preparation of AH-Fc construct:

Construct Cloning:

A DNA fragment containing the mouse Ig kappa chain signal peptide followed by a human Fc and a short bis-amino acid sequence (AH) was codon optimized by gene synthesis (GeneArt) with 5'-NheI and 3'-EcoRI restriction sites. The resulting sequence was restriction digested with both NheI and EcoRI and ligated into NheI and EcoRI sites of vector pPL1146, downstream of a CMV promoter. The ligation was transformed into E coli DH5α cells and colonies containing the correct insert were identified by DNA sequencing. Sequence shown is for the sense strand and runs in the 5' and 3' direction.

AH-Fc

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCT

GGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG

CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATC
TCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGA
GAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGG
ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCA
ATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCT
GCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAG
GCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAAT
TACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCT
GACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGA
ATTC

Sequence of the AH-Fc construct:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG **AH**DKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

AH-Fc Protein Expression and Purification:

AH-Fc expression plasmid DNA was transfected into HEK293T cells at a density of 1 x 10^6 cells per ml using standard polyethylenimine methods. 500 ml cultures were then grown in FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) in 3 L flasks for 4 days at 37 ^{o}C.

AH-Fc protein was purified from clarified conditioned media. Briefly 500 ml of conditioned media was flowed over a 5 ml HiTrap MabSelect SuRe column (GE Life Sciences) at 4 ml/min. The column was washed with 20 column volumes of PBS containing 0.1% Triton X-114 and then the AH-Fc protein was eluted with 0.1M glycine, pH 2.7, neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 9 and dialyzed against PBS. Protein yields were 10 to 20 mg per 500 ml conditioned media and endotoxin levels were <1 EU/mg as measured by the Charles River ENDOSAFE PTS test.

Quality Control of AH-Fc Proteins:

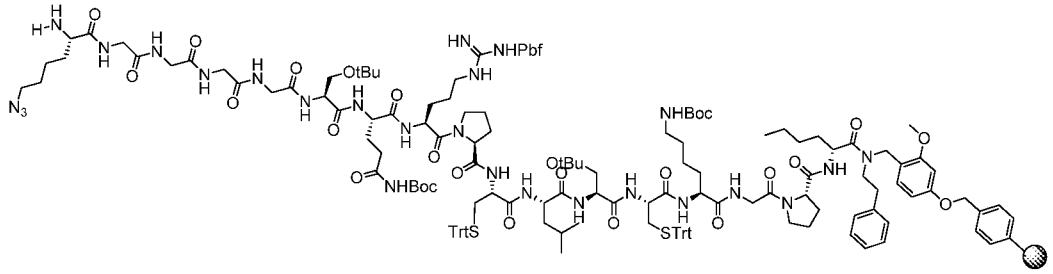
LC/MS of AH-Fc proteins: Peaks were heterogeneous and about 3 kDa larger than expected for dimers. This is characteristic of N-linked glycosylation expected for Fc which has a consensus N-linked glycosylation site.

LC/MS of reduced, N-deglycosylated AH-Fc proteins: gave sharp peaks. The molecular weight for AH-Fc was as expected. The cysteines at the C- terminus appear to protect the protein from cleavage.

Analytical size exclusion on Superdex 200: Fc-Apelin proteins have between 89 and 100% dimer, 0 to 10% tetramer, and 0 to 1% aggregate.

Reducing SDS/PAGE: All proteins migrated as predominately monomers of the expected size.

Step 2: Synthesis of NH_2-AzidoLys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-Phenethylamine



Phenethylamine-AMEBA resin (Sigma Aldrich, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g) was subjected to solid phase peptide synthesis on an automatic peptide synthesizer (CEM Liberty Blue Microwave) with standard double Arg for the Arg residues and D-Nle and Azidolysine coupled double time. Amino acids were prepared as 0.2 M solution in DMF. A standard coupling cycle was defined as follows:

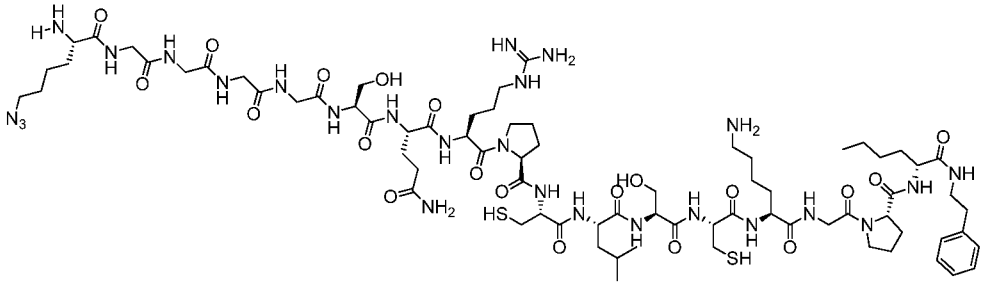
- Amino acid coupling: AA (5 eq.), HATU (5 eq.), DIEA (25 eq.)
- Washing: DMF (3 X 7 mL)
- Fmoc Deprotection: 20% Piperidine/0.1 M HOBt (2 x 7 mL)
- Washing: DMF (4 x 7 mL then 1 x 5 mL)

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time (Temp)	Coupling Method
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-AzidoLys-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU

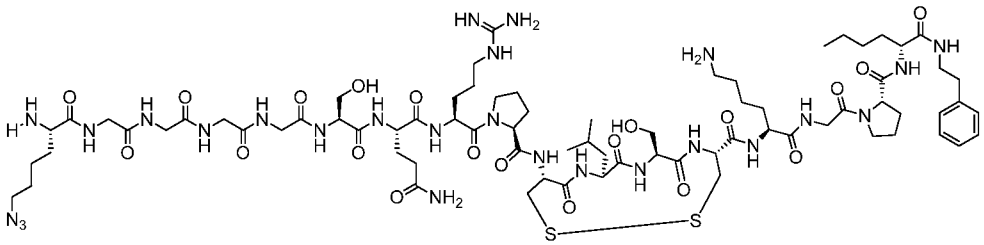
After the assembly of the peptide, the resin was washed with DMF (2 x 50 mL) and DCM (2 x 50 mL) then dried under vacuum to give **Intermediate 42a** (770 mg, 0.250 mmol).

Step 3: Preparation of **Intermediate 42b** *(Cleavage of peptide from resin)*



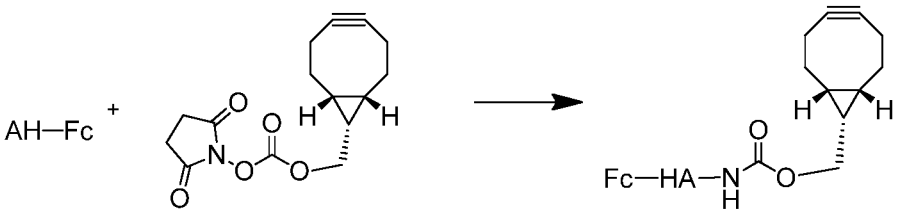
Intermediate 42a (770 mg, 0.250 mmol) was divided in half and each sample was combined with 6 mL TFA solution (37 mL TFA, 1 mL H_2O, 1 mL TIPS, 2.569 g (20eq.) DTT) and shaken at r.t. for 3 hours. The solution was removed from the resin and precipitated into 40 mL cold Et_2O. The solution was vortexed and let stand over ice for 10 minutes before centrifuging at 4000 rpm for 5 minutes. The solvent was removed and the white solid was washed twice more with cold Et_2O (40 mL each time), centrifuged (5 minutes each time) and decanted. The solid was dried under vacuum overnight and purified via M-triggered HPLC yielding **Intermediate 43b** as a white powder (80 mg, 0.045 mmol, 80%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18 column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 2.32 minutes, MS [M+H+2/2] 888.0.

Step 4: Preparation of **Intermediate 42c** *(Cyclization of cysteine residues)*



Intermediate 42b (80 mg, 0.045 mmol) was dissolved in water (1.25 mL) and iodine (50 mM in HOAc, 1.804 mL, 0.090 mmol) was added slowly dropwise and the reaction was mixed at r.t. for 3 hours. LCMS analysis of the crude reaction showed complete conversion of starting material. 0.5 M ascorbic acid was added dropwise until color dissipated. The material was purified via MS-triggered HPLC. Lyophilization of the pooled fractions gave 20.1 mg of the desired product as a white powder (0.045 mmol, 25%). LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18 column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 2.17 minutes, MS [M+H+2/2] 886.8.

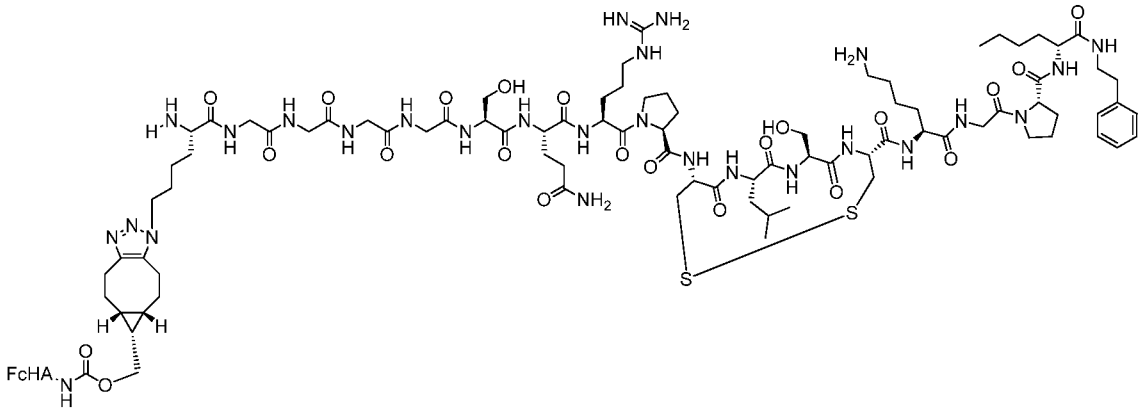
Step 5: Preparation of **Fc-AH BCN** *(Installation of click handle on AH-Fc N-terminus)*



Fc-AH (from step 1: 1 mL, 3 mg/mL, 0.117 µmol) was dissolved in 30 mM NaOAc pH 4.0 (4.3 mL) and a 10mg/mL stock solution of (1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) carbonate (BCN) in DMSO (0.70 mL) was slowly added and the reaction placed on a shaker plate at r.t. for 3 days. BCN (0.25 mL) was added and the reaction was mixed at r.t. for 3 days. BCN (0.70 mL) was added and the reaction was mixed at r.t. for 16 hours. The solution was exchanged into 30 mM NaOAc pH 4.0 using 10 kDa MWCO Amicon centrifugal filter by diluting and concentrating the reaction 5 times to a volume of 900 µL. The solution was centrifuged and supernatant removed. The concentration was measured by A280 to be 1.73 mg/mL (1.56 mg, 26%). LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50°C, Eluent A: Water + 0.1% Formic Acid, Eluent B: CAN + 0.1% Formic Acid, 2-98% over 2 min) R_t = 1.58 min.

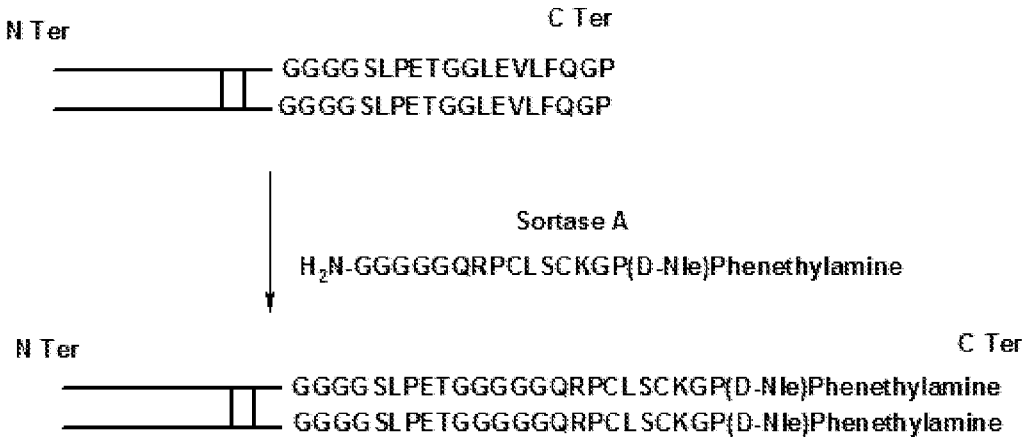
Degree of Labelling	Calculated	Observed	% TIC (MS+) Intensity
AH-Fc	51141	51141.5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

Step 6: Preparation of example 42: Fc-HA-BCN conjugated to Intermediate 43c



A 50 mg/mL stock solution of **intermediate 42c** in H_2O was prepared. **Intermediate 43c** (53.7 µL, 1.515 µmol) was added to a stock solution of **Fc-HA-BCN (from step 5)** in 30 mM NaOAc pH 4.0 (1.73 mg/mL, 1.56 mg, 0.030 µmol) and the reaction was mixed at r.t. for 16 hours. The solution was exchanged into 30 mM NaOAc pH 4.0 using 50 kDa MWCO Amicon centrifugal filter by diluting and concentrating the reaction 5 times to a volume of 250 µL. The concentration was measured by A280 to be 3.32 mg/mL (830 µg, 50%). LCMS (QT2, Protein_35-70 kDa_3min, Proswift Monolith 4.6 x 50 mm, 50°C, Eluent A: Water + 0.1% Formic Acid, Eluent B: CAN + 0.1% Formic Acid, 10-80%B over 2 min) R_t = 1.43 min, MS [M(glycosylated)+H] 54524.5.

Example 43: Fc-apelin conjugate using Sortase:



Step 1: preparation of Fc-Sortase construct:

Construct Cloning:

A DNA fragment containing the mouse Ig kappa chain signal peptide followed by a human Fc and a sortase recognition sequence (LPXTG) was codon optimized by gene synthesis (GeneArt) with 5'-NheI and 3'-EcoRI restriction sites. The resulting sequence was restriction digested with both NheI and EcoRI and ligated into NheI and EcoRI sites of vector pPL1146, downstream of a CMV promoter. The ligation was transformed into E coli DH5α cells and colonies containing the correct insert were identified by DNA sequencing. Sequence shown is for the sense strand and runs in the 5' and 3' direction.

Fc-sortase

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTG
GCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG
GACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAA
GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG
GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACT
GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAG
GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA
ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAA
GCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT

GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAA
GGCGGCGGAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCC
TAAGAATTC

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGLEVLFQGP*

Protein Expression and Purification:

Fc-sortase expression plasmid DNA was transfected into HEK293T cells at a density of 1 x 10^6 cells per ml using standard polyethylenimine methods. 500 ml cultures were then grown in FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) in 3 L flasks for 4 days at 37 ^{o}C.

Fc-sortase protein was purified from clarified conditioned media. Briefly, 500 ml of conditioned media was flowed over a 5 ml HiTrap MabSelect SuRe column (GE Life Sciences) at 4 ml/min. The column was washed with 20 column volumes of PBS containing 0.1% Triton X-114 and then the Fc-sortase protein was eluted with 0.1M glycine, pH 2.7, neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 9 and dialyzed against PBS. Protein yields were 10 to 20 mg per 500 ml conditioned media and endotoxin levels were <1 EU/mg as measured by the Charles River ENDOSAFE PTS test.

Quality Control of Fc-Sortase Protein

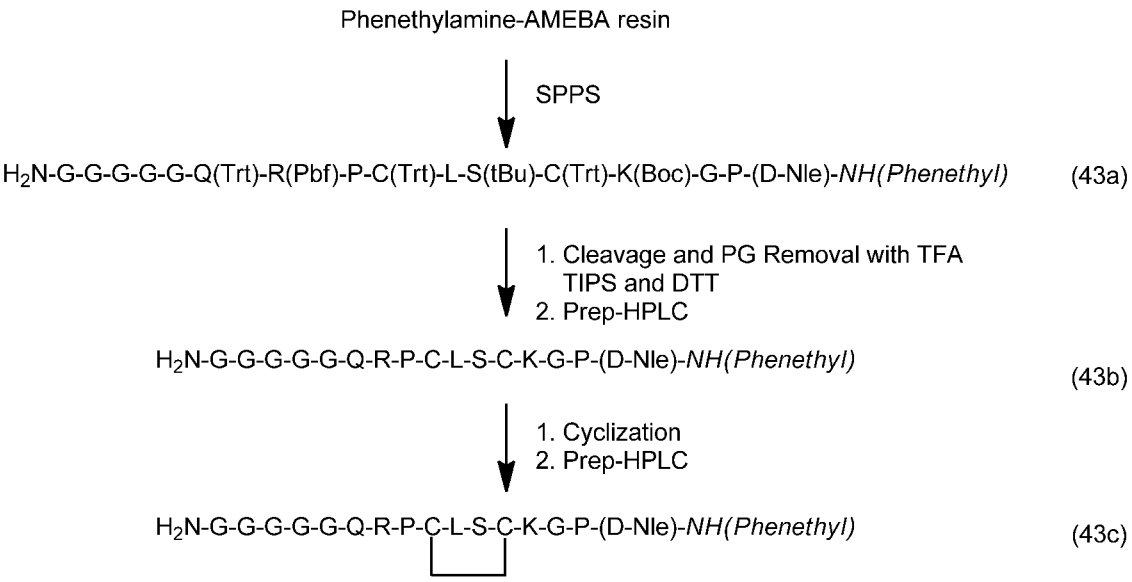
LC/MS of native Fc -sortase protein: Peak was heterogeneous and about 3 kDa larger than expected for dimers. This is characteristic of N-linked glycosylation expected for Fc which has a consensus N-linked glycosylation site.

LC/MS of reduced, N-deglycosylated Fc-sortase protein: Peak was sharp. The molecular weight was 2 daltons less than theoretical, likely due to Cysteine x2 reduction.

Analytical size exclusion on Superdex 200: Fc-sortase protein had between 89 and 100% dimer, 0 to 10% tetramer, and 0 to 1% aggregate.

Reducing SDS/PAGE: The protein migrated predominately as a monomer of the expected size.

Step 2: Preparation of Apelin peptide (H_2N-GGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)Phenethylamine) for Sortase conjugation



Step 2a: Preparation of **Intermediate 43a**

Phenethylamine-AMEBA resin (Sigma Aldrih, 0.25 g, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g) was subjected to solid phase peptide synthesis on an automatic peptide synthesizer (CEM LIBERTY) with standard double Arg for the Arg residues. Amino acids were prepared as 0.2 M solutions in DMF.

A coupling cycle was defined as follows:

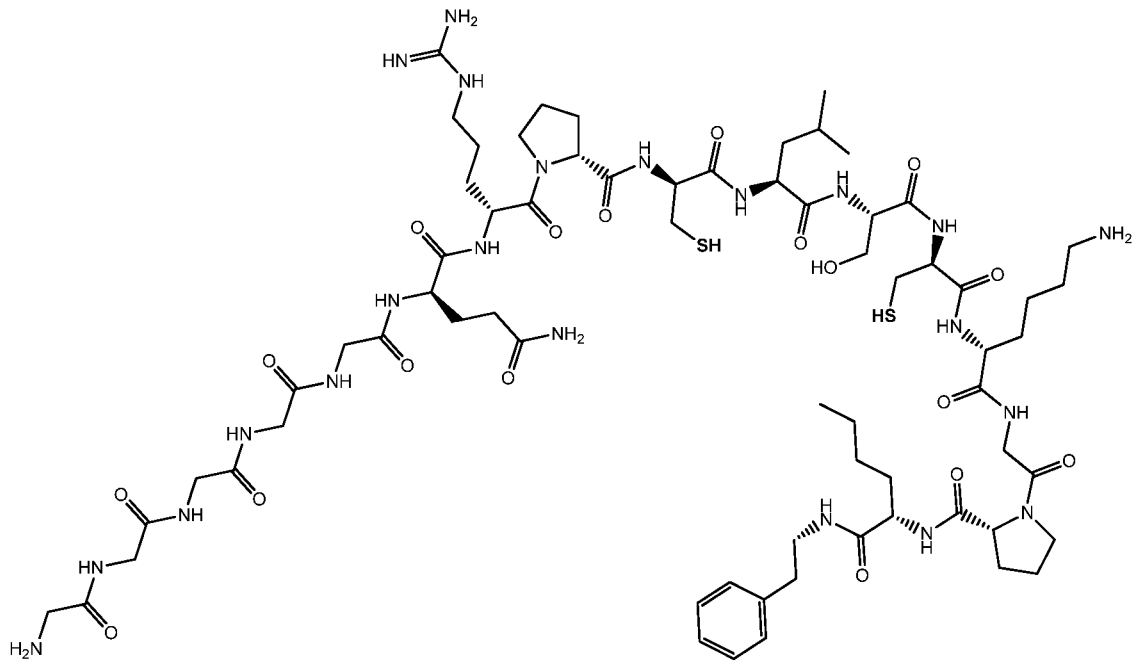
- Amino acid coupling: AA (4.0 eq.), HATU (4.0 eq.), DIEA (25 eq.)
- Washing: DMF (3 x 10 mL, 1 min each time).
- Fmoc deprotection: Piperidine/DMF (1:4) (10 mL, 75 ^{0}C for 1 min, then 10 mL, 75 ^{0}C for 3 min).
- Washing: DMF (4 x 10 mL, 1 min each time).

Coupling	AA	Number of couplings x Reaction time	Reaction Temperature
1	Fmoc-D-Nle-OH	1x 5 min	75 ^{0}C

2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
3	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min at 25 ^{0}C 4 min at 50 ^{0}C
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	2 min at 25 ^{0}C 4 min at 50 ^{0}C
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 30 min	25 min at 25 ^{0}C 5 min at 75 ^{0}C
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
13	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
14	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C

After the assembly of the peptide, the resin was washed with DMF (3 x 10 mL), DCM (3 x 10 mL). The peptide resin was dried under vacuum at room remperature to give **Intermediate 43a** (0.622 g, 0.25 mmol).

Step 2b: Preparation of Intermediate 42b, H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(Phenethyl)



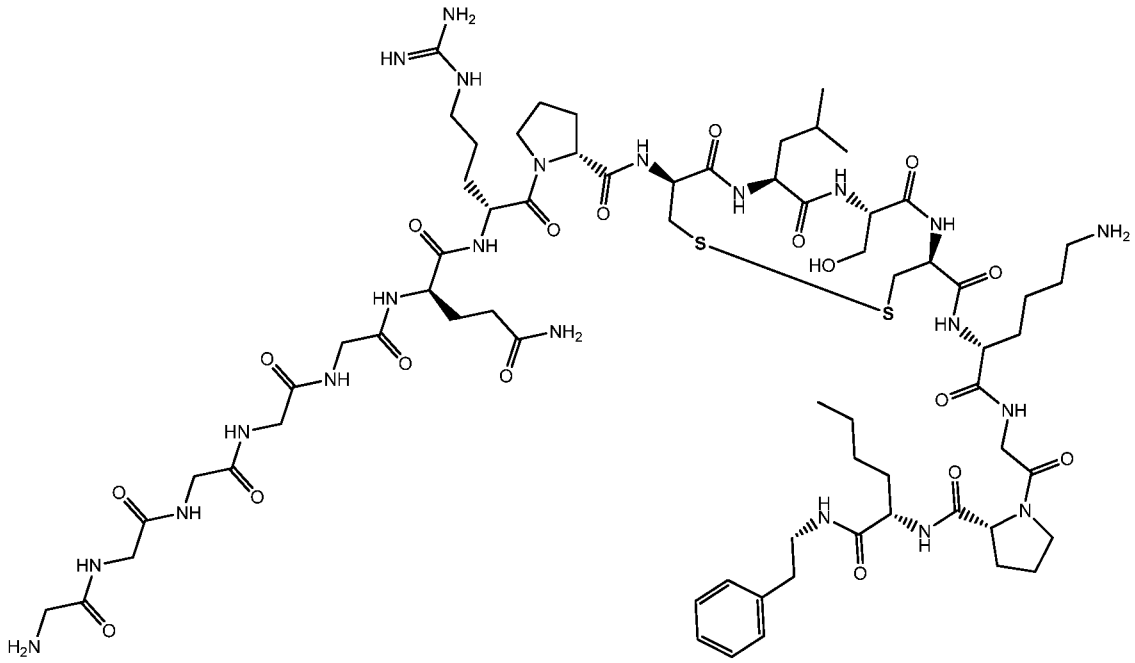
1) Cleavage and protecting group removal

To **intermediate 43a** (0.622 g, 0.25 mmol) was added 3 mL solution of 95%TFA/2.5%H_2O/2.5%TIPS and DTT (771 mg, 5.00 mmol), the resulting mixture was shaked at room temperature for 3 hours, then filtered. The filtrate was dropped into 40 mL of cold ether, then centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes. The solvent was removed and the white solid was washed with ether (3 x 40 mL), vortexed and centrifuged. The solid was dried under high vacuum at 25°C for 1 hour.

2) Purification

The above white solid was then purified by preparative HPLC (Sunfire™ Prep C18 OBD™ 30x50mm 5um column ACN/H_2O w / 0.1% TFA 75ml/min, 10-30% ACN 8 min gradient). The product fraction was lyophilized to give **intermediate 43b** as TFA salt (44 mg, 11%).

Step 3: Preparation of H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)* (disulfide C^9-C^{12}), **intermediate 43c**



To **intermediate 43b** (44 mg, 0.028 mmol) in 0.9 mL of H_2O was added I_2 (50 mM in AcOH, 1.1 mL 0.055 mmol) dropwise. The mixture was shaked at room temperature overnight. LC/MS showed the reaction completed. To the reaction mixture was added several drops of 0.5 M of ascorbic acid solution ($MeOH/H_2O$ = 1/1) until the color of the solution disappered. The mixture was diluted with MeOH for HPLC purification. The purification was carried out by preparative HPLC (Sunfire™ Prep C18 OBD™ 30x50mm 5um column ACN/H2O w/ 0.1% TFA 75ml/min, 10-30% ACN 8 min gradient). The product fraction was lyophilized to give H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)* (disulfide C^9-C^{12}), **intermediate 43c** as TFA salt (13 mg, 30%). LC/MS (QT2, ProductAnalysis-HRMS-Acidic, Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm, 50°C, Eluent A: Water + 0.1% Formic Acid, Eluent B: Acetonitrile + 0.1% Formic Acid, gradient 2% to 98% B/A over 5.15 mins): Rentention time: 0.98 mins; MS $[M+2]^{2+}$: observed: 1587.7993, calculated: 1587.868.

Step 3: Sortase conjugaison of Fc-Sortase and intermediate 43c

1) Chemoenzymatic Sortase Conjugation

On ice bath, to the Fc-Sortase (698 µl, 0.040 µmol, 3.15 mg/mL) in PBS (pH7.4) buffer solution was added the solution of H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-

NH(Phenethyl) (disulfide C^9-C^{12}) (64.1 µL, 2.018 µmoL, 50 mg/mL) in Tris-8.0 buffer, followed by 520 µM of sortase A (78 µL, 0.040 µmoL) in 50 mM Tris-Cl pH7.4, 150 mM NaCl. The mixture was shaked at room temperature overnight. LC/MS showed the reaction completed.

2) Purification and desalting

The above solution was flowed over a 5 mL HiTrap Mab Select SuRe column (GE Lifesciences # 11-0034-95) at 4mL/min on ATTA XPRESS. Example 43 was washed on the column with 20 column volumes (CV) PBS + 0.1% Triton 114 and eluted with 0.1M glycine, pH 2.7, neutralized with 1 M tris-HCl, pH 9 and dialyzed versus PBS. The purified solution was desalted by using Zeba Sping Desalting Column, 5mL (89891) to give 1.5mL target solution, the average concentration was 0.598 mg/mL, and the recoverage was 90%. LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, AcQuity ProSwift RP-3U 4.6 x 50 mm, 1.0 mL/min, Eluent A: Water + 0.1% Formic Acid, Eluent B: Acetonitrile + 0.1% Formic Acid, gradient 2% to 98% B/A over 3 mins): R_t = 1.55 minutes, MS [M+H] 58845.0000.

Sequence of the Example 43:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*GGG*
251 *GSLPETGGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)Phenethylamine*

wherein LSLSPGK*GGG GSLPETGGGGG* represents the linker and *QRPC*LSC*KGP(D-Nle)Phenethylamine the polypeptide.*

The polypeptides 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 to the activation of the APJ receptor, such as the diseases disclosed herein.

Furthermore, half-life of these peptides can be further extended by forming a bioconjugate comprising a peptide or polypeptide according to any one of Formula I to IV with a half-life extending moiety, such as Human serum Albumin or a Fc domain.

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

1. A cyclic polypeptide having the following formula I:

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

wherein:

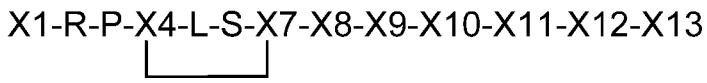
X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent, Q, A or pE or X1 is selected from C, c, hC, D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC form a disulfide bond with the side chain of X7;
X3 is P or X3 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
X4 is R or X4 is selected from C, c, hC and D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC forms a disulfide bond with the side chain of X7;
wherein only one of X1, X3 and X4 is a sulfur contain amino-acid selected from C, c, hC and D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of either X1, X3 or X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , Nle, M or f; and
X12 is absent or P, f, a, D-Nva or D-Abu;

X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; wherein:
Nle is L-norleucine;
D-Nle is D-norleucine;
D-hC is D-homocysteine
hC is L-homocysteine;
Nal is L-naphathaline;
D-Nva is D-norvaline;
D-Abu is D-2-aminobutyric acid;

pE is L-pyroglutamic acid;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide; or a polypeptide substantially equivalent thereto.

2. The polypeptide of claim 1 having Formula II:



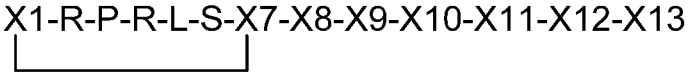
II

wherein:

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent or is selected from Q, A and pE;
X4 is C, c, hC or D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of X4;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle , Nle, M or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from F, (N-Me)F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

3. The polypeptide of claim 1 having Formula III:



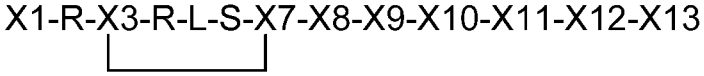
III

Wherein

X1 is the N-terminus of the polypeptide and is selected from C, c, hC and D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; wherein the side chain of X7 forms a disulfide bond with the side chain of X1;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle, Nle, M or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal;
or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

4. The polypeptide of claim 1 having Formula IV:



IV

wherein:
X1 is the N-terminus of the polypeptide and is either absent, Q, A or pE;
X3 is C, c, hC or D-hC; wherein the side chain of C, c, hC or D-hC;
X7 is C, c, hC or D-hC; and the side chain of X7 form a disulfide bond with the side chain of C, c, hC or D-hC of X3;

X8 is K or F;
X9 is G, A, a or absent;
X10 is P or absent;
X11 is D-Nle, Nle, M or f; and
X12 is absent or is selected from P, f, a, D-Nva and D-Abu;
X13 is the C-terminus and is absent or is selected from (N-Me)F, F, f, a, y and Nal; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

5. The polypeptide according to any one of claims 1, 2and 4 wherein X1 is pE; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

6. The polypeptide according to any one of claims 1, 2 and 4 wherein X1 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

7. The polypeptide according to any one claims 1 to 4 and 6 wherein the N-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

8. The polypeptide according to claim 7 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.

9. The polypeptide according to any one of claims 1 to 8 wherein X13 is F or f; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

10. The polypeptide according to any one of claims 1 to 8 wherein X13 is absent; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

11. The polypeptide according to any one of claims 1-10 wherein X12 is absent; or an amide, and ester or a salt of the polypeptide.

12. The polypeptide according to any one of claims 1 to 11 wherein the C-terminus is an amide; or a salt of the polypeptide.

13. The polypeptide according to claim 12 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.

14. The polypeptide according to any one of claims 1-13 wherein X8 is K; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

15. The polypeptide according to any one of claims 1 to 14 wherein X9 is G; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

16. The polypeptide according to any one of claims 1 to 15 wherein X10 is P; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

17. The polypeptide according to any one of claims 1 to 16 wherein X11 is Nle or D-Nle; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

18. The polypeptide according to claim 1 selected from:

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Phenethyl)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(Phenethyl)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Phenethyl)*
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH_2*
*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(Phenethyl)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Phenethyl)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(Phenethyl)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*

*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

wherein the two amino acids labeled with "*" represent the amino acids forming a disulfide; or an amide, an ester or a salt of the polypeptide.

19. A bioconjugate or multimer thereof comprising:

a. a peptide or polypeptide according to any one of claims 1 to 18, or an amide, an ester or a salt thereof, and

b. a half-life extending moiety;

wherein said peptide or polypeptide and half-life extending moiety are covalently linked or fused, optionally via a linker.

20. The bioconjugate or a mutimer thereof, according to claim 19, wherein the half-life extending moiety is an IgG constant domain or fragment thereof or a human Serum Albumin.

21. The bioconjugate according to claims 19 or 20 wherein the half-life extending moiety is a FcLALA modified Fc fragment with a LALA mutation (L234A, L235A).

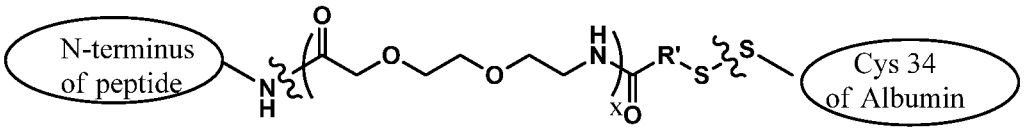
22. The bioconjugate according to claim 21 wherein the half-life extending moiety is a Fc domain which is fused to a polypeptide of Formula I, II, III or IV via a linker and wherein the linker has the following Formula:
-[GGGGS]n-, n is 1, 2 or 3 or the linker is GS or GG, and the polypeptide of Formula I, II, III or IV contains naturally occurring amino acids.

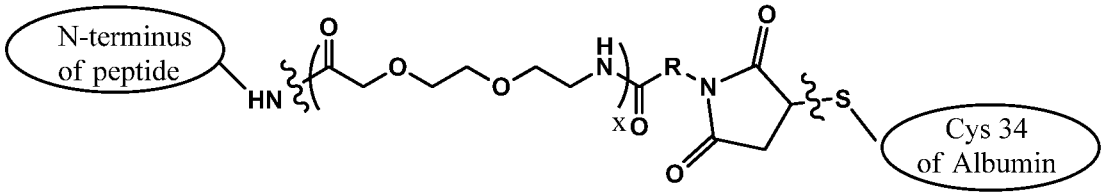
23. The bioconjugate according to claim 22 wherein the polypeptide is a polypeptide of Formula I is selected from QRPC*LSC*KGPMPF, C*RPRLSC*KGPMPF and QRC*RLSC*KGPMPF, wherein the two amino acids labeled with "*" represent the amino acids forming a disulfide or amide bond via their side chain.

24. The bioconjugate according to claim 22 or 23 wherein the half-life extending moiety is a modified Fc domain wherein the C-terminal Lysine has been deleted or replaced with Alanine.

25. The bioconjugate or multimer thereof according to claim 19 or 20 wherein the half-life extending moiety is Human Serum Albumin.

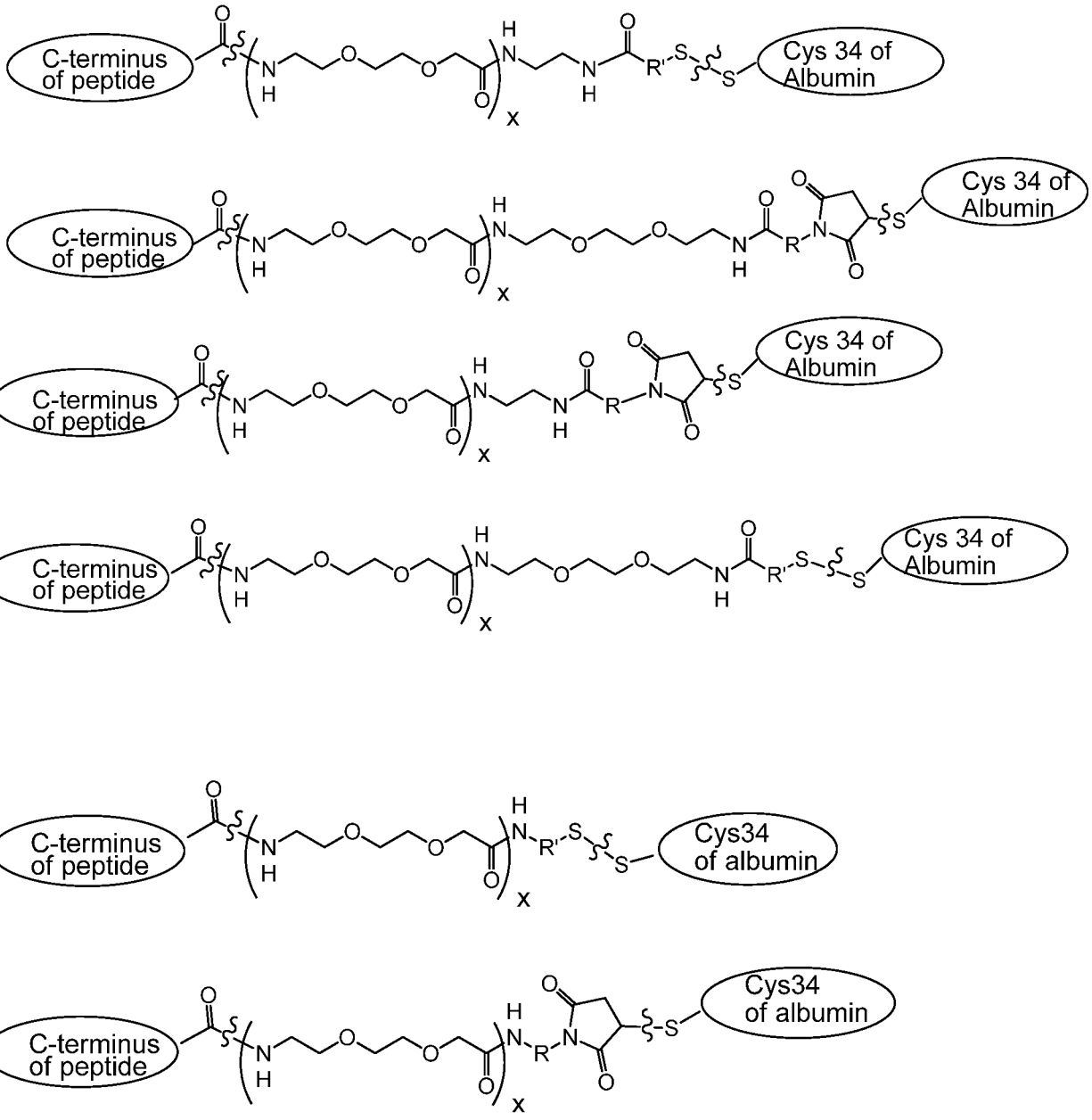
26. The bioconjugate according to claim 25 wherein the Human Serum Albumin is chemically linked to the N-terminus of a polypeptide of any one of Formulae I to IV via a linker of the following Formulae:





wherein x is 1- 20, R is linear or branched alkylene, cycloalkyl, aryl of heteroaryl or combination thereof, R' is linear or branched alkylene, aryl or cycloalkyl or combination thereof.

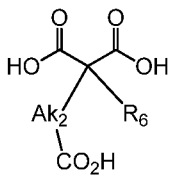
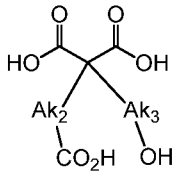
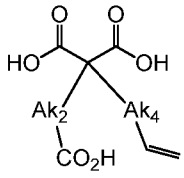
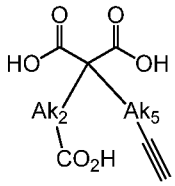
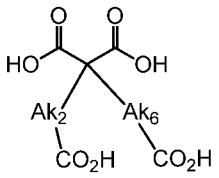
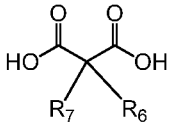
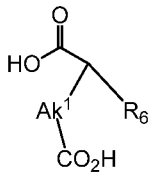
27. The bioconjugate according to claim 19 or 20 wherein the Human Serum Albumin is chemically linked to the C-terminus of a polypeptide of any one of Formulae I to IV via a linker of the following Formulae:



wherein x is 1-20, R is linear or branched alkylene, cycloalkyl, aryl of heteroaryl or combination thereof, R' is linear or branched alkylene, aryl or cycloalkyl or combination thereof.

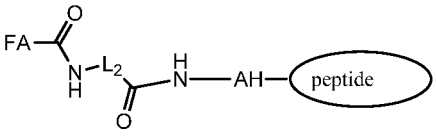
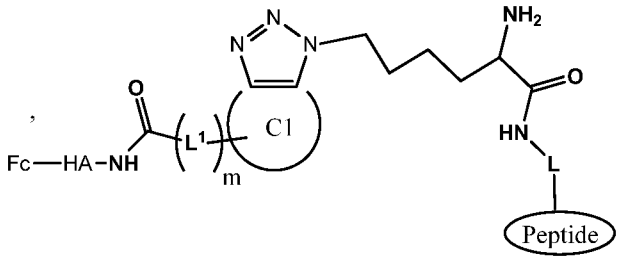
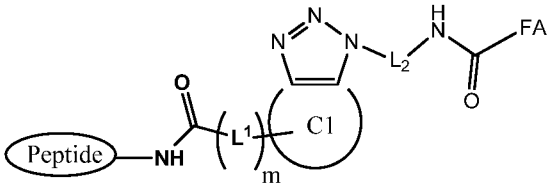
28. The bioconjugate according to claim 19 wherein the half-lfe extending moiety is a fatty acid.

29. The bioconjugate according to claim 28 wherein the fatty acid is selected from:







and


wherein Ak^2, Ak^3, Ak^4, Ak^5 and Ak^6 are independently a (C_{8-20})alkylene, R^6 and R^7 are independently (C_{8-20})alkyl.

30. The bioconjugate according to claim 19, 28 or 29 having the following formula:

or



wherein peptide is the N-terminus of the peptide, n is 1, 2 or 3, m is 0 or 1, A is alanine, H is histidine, L2 is a linker, C1 is a mono, di or tricyclic carbocyclic or heterocyclic ring system

optionally substituted with fluorine and L^1 is a C1-C20 alkylene linker wherein the alkylene chain is optionally substituted with oxo (=O), and wherein one or more carbon is replaced with O or NH.

31. 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 or an amide, an ester or a salt thereof, or bioconjugate thereof, according to any one of claims 1 to 30.

32. The method of claim 31 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.

33. A polypeptide or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof, according to any one of claims 1 to 30, for use as a medicament.

34. A polypeptide or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof, according to any one of claims 1 to 30, for use in the treatment or prevention of a disease or disorder responsive to the agonism of the APJ receptor.

35. A polypeptide, an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate thereof according to any one of claims 1 to 30 or 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.

36. A Combination comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide, an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate thereof, according to any one of claims 1-30, and one or more therapeutically active co-agent.

37. A combination according to claim 36 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.

38. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide, an amide, an ester of a salt thereof, or a bioconjugate thereof, according to any one of claims 1 to 30, and one or more pharmaceutically acceptable carriers.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/047377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 A61K38/17 A61P9/04
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)
C07K A61K

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, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIDOROVA M V ET AL: "Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogues", RUSSIAN JOURNAL OF BIOORGANIC CHEMISTRY, M A I K NAUKA - INTERPERIODICA, RU, vol. 38, no. 1, 28 January 2012 (2012-01-28), pages 40-51, XP002706051, ISSN: 1068-1620, DOI: 10.1134/S1068162012010177 page 31, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 5; table 1 -----	1-38

☐ 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
14 November 2014	25/11/2014

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	Fuhr, Christian

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 *

160122 PAT055418 LISTADO DE SECUENCIAS Es.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> POLIPÉPTIDOS CÍCLICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARDIACA

<130> PAT055418-WO-PCT

<140> PCT/US2014/047377
<141> 2014-07-21

<150> 62/015,854
<151> 2014-06-23

<150> 61/858,263
<151> 2013-07-25

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTEE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Ala" o "pyroGlu" o "Cys" o "D-Cys" o
"homoCys" o "D-homoCys" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Cys" o "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Cys" o "D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Nle" o "Met" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(13)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"
<400> 1

Gln Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Ala" o "pyroGlu" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE

<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Met" o "Nle" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(13)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener

160122 PAT055418 LISTADO DE SECUENCIAS Es. una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"

<400> 2
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial: Synthetic
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> VARIANTE

<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Nle" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica

<222> (1)..(13)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"

<400> 3
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Nle" o "Met" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(13)

<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"

<400> 4
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Ala" o "pyroGlu" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Nle" o "Met" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(13)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"

<400> 5
Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="D-Cys" o "homoCys" o "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala" o "D-Ala" o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Nle" o "D-Phe"

<220>
<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="D-Phe" o "D-Ala" o "D-Nva" o "D-Abu"
o " "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (13)..(13)
<223> /reemplazar="(N-Me)Phe" o "D-Phe" o "D-Ala" o "D-Tyr"
o "Nal" o " "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(13)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Véase la solicitud como fue presentada para tener una descripción detallada
de las sustituciones y modalidades preferidas"

<400> 6
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(15)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(15)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 1-3 'Gly Gly Gly Gly Ser'
Unidades de repetición, en donde algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(15)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 8

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 9
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 10
Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(12)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> misc_característica

<222> (1)..(12)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender 1-3 'Gly Gly Gly Gly Ser'
Unidades de repetición, en donde algunas posiciones pueden estar ausentes"
<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(17)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones
para las posiciones variantes VARIANTES"

<400> 11
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Leu

<210> 12
<211> 15
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 13
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 14
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 15
Gly Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
1 5 10 15

Pro

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 16
Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 26

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(12)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)
<223> /note="This region may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly'
repeating units wherein some positions may be absent"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(26)
<223> /nota="los residuos VARIANTES dados en la secuencia no tienen
preferencia frente a aquellos en las anotaciones

para las posiciones variantes VARIANTES"

<400> 17
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
20 25

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 18
Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 19
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 20

<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 20
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> (N-Me)Phe

<400> 21
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 22
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Nal

<400> 23
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 24
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 25
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Ala

<400> 26
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 27
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 28
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 29
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 30
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 31
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 32
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 33
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 34
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 35

<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 35

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>

<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 36
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 37
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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 Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 39
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:

Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 40
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 41
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 42
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 43
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 44
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Abu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 45
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Xaa Phe
1 5 10

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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 Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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> (N-Me)Phe

<400> 47
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 48
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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 Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 50
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 51
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Phe

<400> 52
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Phe
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 53
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Phe

<400> 54
Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 55
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>

<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Tyr

<400> 56
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Nva

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 57
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Val Phe
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)

<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 58
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 59
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 60
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>

<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 61
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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> D-Nle

<400> 62
Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la 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> (6)..(6)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Lys(tBoc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> D-Nle

<400> 63
Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> N6-[[(1-alfa,8-alfa,9-alfa)-biciclo[6.1.0]
non-4-in-9-ilmetoxy]carbonil]-Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 64
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Nle

<400> 65
Ala His Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 766
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Polinucléotido sintético"

<400> 66
gctagccacc atggaaactg acaccctgct gctgtgggtc ctgctgctgt gggtgcctgg
60

cagcactggc gctcatgata agacacacac atgccccct tgtccagcac cagaggcagc 120

tggaggacca agcgtgttcc tgtttccacc caagcctaaa gacacactga tgatctcaag 180

gaccccagaa gtcacatgcg tggtcgtgga cgtgtctcac gaggaccccg aagtcaagtt 240

caactggtac gtggatggcg tcgaggtgca taatgctaag accaaacccc gagaggaaca 300

gtacaacagc acctatcggg tcgtgtccgt cctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa 360

cggcaaagag tataagtgca aagtgagtaa taaggctctg cctgcaccaa tcgagaaaac 420

aatttctaag gctaaagggc agccaagaga accccaggtg tacactctgc ctccatctag 480

ggaggaaatg acaaagaacc aggtcagtct gacttgtctg gtgaaaggct tctacccctc 540

cgacatcgca gtggagtggg aatctaatgg ccagcctgaa aacaattaca agaccacacc 600

ccctgtgctg gactccgatg ggtctttctt tctgtattct aagctgaccg tggataaaag
660

tcggtggcag cagggaaacg tcttctcatg cagcgtgatg cacgaggccc
tgcacaatca 720

ttacacacag aagtccctgt ctctgagtcc aggcaaatga gaattc
766

<210> 67
<211> 245
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Polipéptido sintético"

<400> 67
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Ala His Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
35 40 45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
180 185 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
195 200 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
210 215 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Azido-Lys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)
<223> D-Nle

<400> 68
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro
1 5 10 15

Leu

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 69
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe
1 5 10 15

Gln Gly Pro

<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> D-Nle

<400> 70
Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> D-Nle

<400> 71
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg
1 5 10 15

Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
20 25

<210> 72

<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Any amino acid

<400> 72
Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 73
<211> 817
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Polinucleótido sintético"

<400> 73
gctagccacc atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg
60

cagcaccggc gataagaccc acacctgtcc tccctgtcct gcccctgaag
ctgctggcgg 120

ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca
gccggacccc 180

cgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg
240

gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg
aacagtacaa 300

cagcacctac cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc
tgaacggcaa 360

agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaga
aaaccatcag 420

caaggccaag ggccagcccc gcgaacccca ggtgtacaca ctgccccta gccgggaaga 480

gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat 540

cgccgtggaa tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt 600

gctggacagc gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg acagtggaca agagccggtg 660

gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac 720

ccagaagtcc ctgagcctga gccctggaaa aggcggcgga ggctctctgc ctgaaacagg 780

cggactggaa gtgctgttcc agggccccta agaattc 817

<210> 74
<211> 261
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Polipéptido sintético"

<400> 74
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
165 170 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
180 185 190

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
225 230 235 240

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val
245 250 255

Leu Phe Gln Gly Pro
260

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Gln(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> D-Nle

<400> 75
Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 76
<211> 267
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Polipéptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (267)..(267)
<223> D-Nle

<400> 76
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

165 170 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
180 185 190

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
225 230 235 240

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
260 265

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<400> 77
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly
20

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /note="Desripción de la Secuencia Artificial:
Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 78
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

<120> CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

<130> PAT055418-WO-PCT

<140> PCT/US2014/047377
<141> 2014-07-21

<150> 62/015,854
<151> 2014-06-23

<150> 61/858,263
<151> 2013-07-25

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or "Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Cys" or "D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)

<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 1

Gln Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>

<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT

<222> (11)..(11)
<223> /replace="Met" or "Nle" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 2
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace=" "

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Nle" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 3
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT

<222> (1)..(1)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

Sequence Listing

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 4
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Ala" or "pyroGlu" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>

<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Nle" or "Met" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"
or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 5
Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace=" "

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /replace="D-Cys" or "homoCys" or "D-homoCys"

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> /replace="Ala" or "D-Ala" or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> VARIANT
<222> (11)..(11)
<223> /replace="Nle" or "D-Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="D-Phe" or "D-Ala" or "D-Nva" or "D-Abu"
or " "

<220>
<221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="(N-Me)Phe" or "D-Phe" or "D-Ala" or "D-Tyr"

or "Nal" or " "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<220>
<221> source
<223> /note="See specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments"

<400> 6
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(15)
<223> /replace=" "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /note="This sequence may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly Ser' repeating units wherein some positions may be absent"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10
Gln Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Met Pro Phe
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(12)
<223> /replace=" "

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)
<223> /note="This region may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly' repeating units wherein some positions may be absent"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 11
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr

1 5 10 15

Leu

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15
Gly Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
1 5 10 15

Pro

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16
Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(12)
<223> /replace=" "

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(12)
<223> /note="This region may encompass 1-3 'Gly Gly Gly Gly' repeating units wherein some positions may be absent"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 17
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Pro Glu Thr
1 5 10 15

Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
20 25

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18
Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
1 5 10 15

Ala Phe

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 19
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 20
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro

1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> (N-Me)Phe

<400> 21
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 22
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Nal

<400> 23
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 24
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 25
<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 25
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Ala

<400> 26
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Ala

1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 27
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 28
<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 28
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 29
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 29
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 30
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 31
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 32
<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 32
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 33
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe

1 5 10

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 34
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 35
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 36
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 37
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 38
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 39
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 40
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 41
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 41
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 42
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Ala Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 43
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 44
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 45

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Abu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 45
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Xaa Phe
1 5 10

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 46
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<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> (N-Me)Phe

<400> 47
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 48

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 48
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 49

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 49
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 50

<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 50
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 51

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>

<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 51
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>

<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Phe

<400> 52
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Phe
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 53
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Phe Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 54
<211> 10

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> D-Phe

<400> 54
Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Leu Ala Phe

1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 55
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-Cys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)

<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Tyr

<400> 56
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> D-homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> homoCys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Nva

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 57
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Val Phe
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 58
Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> D-Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Nle

<400> 59

Cys Arg Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>

<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> D-Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Phe

<400> 60
Glu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)

<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 61
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<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> D-Nle

<400> 62
Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<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> (6)..(6)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Lys(tBoc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> D-Nle

<400> 63
Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> pyroGlu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> N6-[[(1-alpha,8-alpha,9-alpha)-bicyclo[6.1.0] non-4-yn-9-ylmethoxy]carbonyl]-Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 64
Glu Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> D-Nle

<400> 65
Ala His Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 766
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 66
gctagccacc atggaaactg acaccctgct gctgtgggtc ctgctgctgt gggtgcctgg 60

cagcactggc gctcatgata agacacacac atgccccct tgtccagcac cagaggcagc 120

tggaggacca agcgtgttcc tgtttccacc caagcctaaa gacacactga tgatctcaag 180

gaccccagaa gtcacatgcg tggtcgtgga cgtgtctcac gaggaccccg aagtcaagtt 240

caactggtac gtggatggcg tcgaggtgca taatgctaag accaaacccc gagaggaaca 300

gtacaacagc acctatcggg tcgtgtccgt cctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa 360

cggcaaagag tataagtgca aagtgagtaa taaggctctg cctgcaccaa tcgagaaaac 420

aatttctaag gctaaagggc agccaagaga accccaggtg tacactctgc ctccatctag 480

ggaggaaatg acaaagaacc aggtcagtct gacttgtctg gtgaaaggct tctacccctc 540

cgacatcgca gtggagtggg aatctaatgg ccagcctgaa aacaattaca agaccacacc 600

ccctgtgctg gactccgatg ggtctttctt tctgtattct aagctgaccg tggataaaag 660

tcggtggcag cagggaaacg tcttctcatg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaatca 720

ttacacacag aagtccctgt ctctgagtcc aggcaaatga gaattc 766

<210> 67
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

Sequence Listing

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 67

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Ala His Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
35 40 45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
65 70 75 80

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

85 90 95

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
100 105 110

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
115 120 125

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
130 135 140

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
145 150 155 160

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
165 170 175

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
180 185 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
195 200 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
210 215 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Azido-Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> D-Nle

<400> 68
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro
1 5 10 15

Leu

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 69
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val Leu Phe
1 5 10 15

Gln Gly Pro

<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>

<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> D-Nle

<400> 70
Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 71
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> D-Nle

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg
1 5 10 15

Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
20 25

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Any amino acid

<400> 72
Leu Pro Xaa Thr Gly

<210> 73
<211> 817
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 73
gctagccacc atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg 60

cagcaccggc gataagaccc acacctgtcc tccctgtcct gcccctgaag ctgctggcgg 120

ccctagcgtg ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc 180

cgaagtgacc tgcgtggtgg tggatgtgtc ccacgaggac cctgaagtga agttcaattg 240

gtacgtggac ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa 300

cagcacctac cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa 360

agagtacaag tgcaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaga aaaccatcag 420

caaggccaag ggccagcccc gcgaacccca ggtgtacaca ctgccccccta gccgggaaga 480

gatgaccaag aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat 540

cgccgtggaa tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccctgt 600

gctggacagc gacggctcat tcttcctgta cagcaagctg acagtggaca agagccggtg 660

gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac 720

ccagaagtcc ctgagcctga gccctggaaa aggcggcgga ggctctctgc ctgaaacagg 780

cggactggaa gtgctgttcc agggccccta agaattc 817

<210> 74
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 74
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

145 150 155 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
165 170 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
180 185 190

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
225 230 235 240

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Leu Glu Val
245 250 255

Leu Phe Gln Gly Pro
260

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Gln(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Arg(Pbf)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Ser(tBu)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Cys(Trt)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Lys(Boc)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> D-Nle

<400> 75

Gly Gly Gly Gly Gly Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10 15

<210> 76
<211> 267
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (267)..(267)
<223> D-Nle

<400> 76
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu
20 25 30

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
35 40 45

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65 70 75 80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
85 90 95

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
100 105 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
115 120 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
130 135 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
165 170 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
180 185 190

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
195 200 205

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
210 215 220

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
225 230 235 240

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
260 265

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 77
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Thr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly

20

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> D-Nle

<400> 78
Gln Arg Pro Cys Leu Ser Cys Lys Gly Pro Leu
1 5 10

Resumen

La invención proporciona un polipéptido cíclico de la Fórmula I' (SEQ ID NO: 1):

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

o una amida, un éster o una sal del mismo, o un bioconjugado del mismo, en donde X1, X3, X4, X7, X8, X9, X10, X11, X12 y X13 se definen en la presente. Los polipéptidos son agonistas del receptor APJ. La invención también se refiere a un método para la fabricación de los polipéptidos de la invención o bioconjugados de los mismos, y sus usos terapéuticos tales como el tratamiento o la prevención de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (IDAC), insuficiencia cardiaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia. La presente invención además proporciona una combinación de agentes farmacológicamente activos y una composición farmacéutica.