

Respuesta a Requerimientos

1	Datos del Solicitante				
	Nombre:	CARLOS R. OLARTE GARCIA	Dirección Electrónica:	patents@olartemoure.com	
	Dirección:	patents@olartemoure.com	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.	
	Identificación:				
	☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT		
	Número:	79782747-			
2	Dato de la Creación				
	Identificación de la Creación	No. de Certificado	Vigencia	No. de Expediente	Tipo Trámite
	BIOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS DE APELINA SINTÉTICA	000000		16025039	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
3	Texto de la Comunicación	RESPUESTA AL OFICIO No. 2360, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 011 DE FECHA 15 DE MARZO DE 2016 (EXAMEN DE FORMA) P2016/000012			
4	Anexos				

☒ Anexos



Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re.: Expediente No. 16-025.039

Solicitud de Patente de Invención titulada: “BIOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS DE APELINA SINTÉTICA”.

Solicitante: Novartis AG

Nuestra Ref.: P2016/000012

RESPUESTA AL OFICIO No. 2360, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA

No. 011 DE FECHA 15 DE MARZO DE 2016

(EXAMEN DE FORMA)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 39 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, me permito presentar voluntariamente un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado al momento de radicar la solicitud. Así, en el Capítulo Reivindicatorio Modificado se realizan los siguientes cambios:

- se eliminan las Reivindicaciones 8 a 19, 28, 29 y 32 a 37;
- las nuevas Reivindicaciones 9 a 21 corresponden con las antiguas Reivindicaciones 20 a 27, 30, 31 y 38 a 40, respectivamente;
- se incluyeron los respectivos números de secuencias de los polipéptidos en las Reivindicaciones 1, 2, 5 a 9, 12 y 15;
- en las nuevas Reivindicaciones 18 y 20 (antiguas Reivindicaciones 31 y 39), se reemplazaron los términos “polipéptido” por “bioconjugado” y “amida, éster o sal” por “multímero”.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud original.

iii) Adicionalmente, con el fin de dar mayor claridad, me permito anexar a la presente un Capítulo Descriptivo Modificado, en el cual se han agregado los números de secuencia para cada una de las estructuras de los polipéptidos que se mencionan.

2. a- El Examinador señala que el Capítulo Reivindicatorio presenta más de 10 reivindicaciones, por lo cual solicita el pago de la tasa establecida para cada reivindicación adicional presentada, de lo contrario no serán tenidas en cuenta durante el trámite.

b- El Capítulo Reivindicatorio contiene 20 reivindicaciones, por lo que el pago de reivindicaciones adicionales corresponde a 11 reivindicaciones. En este sentido, me permito adjuntar el comprobante de pago por 11 reivindicaciones adicionales, por lo que considero superada la anterior objeción.

3. a- El Examinador argumenta que el título de la solicitud no es claro porque hace referencia a materia no patentable.

b- Al respecto, me permito aclarar que la solicitud se titula “BIOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS DE APELINA SINTÉTICA”, por lo que no se hace referencia en ningún momento a usos o métodos de tratamiento, considerados como materia no patentable, por lo cual considero superada la objeción del Examinador.

4. a- El Examinador señala que en el Capítulo Reivindicatorio se incluye materia que no es objeto de patentabilidad como métodos de tratamiento y usos.

b- i) En primer lugar, considero que el anterior requerimiento es ilegal, teniendo en cuenta que en la etapa del examen de forma solamente se pretende la verificación de requerimientos específicos enlistados en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, y no para un análisis de fondo de la solicitud (por ejemplo, análisis de la claridad, soporte o unidad de invención), el cual debería evaluarse durante el examen de fondo a la luz del artículo 45.

Es decir, en relación con la evaluación de requisitos de forma, la Decisión 486 sólo se refiere al cumplimiento de las disposiciones de los artículos 26 y 27, tal como que la solicitud **contenga** una o más reivindicaciones, **independientemente** del contenido técnico o extensión del mismo.

Lo anterior se encuentra claramente establecido en el Manual Andino de Patentes (MAP), en donde establece con respecto al Examen de Forma que “*En el examen de forma, el Examinador de forma **no realiza un examen profundo para verificar el contenido**, claridad y comprensión de la descripción; es esencial sin embargo que el documento sea suficientemente legible*”¹. De hecho, el MAP establece respecto al Examen de Forma que dicho examen consiste en la verificación de: petitorio, Descripción, Reivindicaciones, Dibujos, Resumen, Poderes (si fuere el caso), Copia del contrato de acceso o de uso de conocimiento tradicionales (si fuere el caso), Certificado de depósito del material biológico (si fuere el caso). Documento de cesión de derechos del inventor al solicitante e Idioma.²

Es más, respecto al examen de forma de las reivindicaciones, el MAP establece que “*En esta etapa del examen, de igual manera que para la descripción, **no se analizan la claridad ni concisión de las reivindicaciones**. Basta con que el examinador de forma reconozca algo que parezca un capítulo reivindicatorio, estos requisitos se vuelven importantes en el momento de entrar a analizar la solicitud en el examen de fondo ya que mediante ellas se medirá la extensión de la patente*”³ (énfasis fuera de texto). Por lo tanto, si bien, con el fin de facilitar el trámite proporciono **voluntariamente** un Capítulo Reivindicatorio Modificado en el que se eliminan algunas reivindicaciones y se hacen algunos cambios voluntarios, considero que este requerimiento en esta etapa del trámite es injustificado y se extralimita según las disposiciones legales aplicables y por el contrario señalo que la claridad, la concisión y unidad de invención de las reivindicaciones **no deben** ser estudiadas durante el examen de forma y no le corresponde al solicitante pronunciarse sobre ello en esta etapa del trámite.

ii) Vale la pena resaltar además que el Solicitante **no ha pedido formalmente** que la SIC examine si la invención es patentable, tal como lo establece el Artículo 44 de la Decisión 486, el cual señala que “*Dentro del plazo de seis meses contados desde la publicación de la solicitud, independientemente que se hubieren presentado oposiciones, **el solicitante deberá pedir que se examine si la invención es patentable**. Los Países Miembros podrán cobrar una tasa para*

¹ Manual Andino de Patentes. ISBN-9978-43-855-6 Sección 5.2

² Manual Andino de Patentes. ISBN-9978-43-855-6 Sección 5, subsecciones 5.1 a 5.10, p. 25 a 28.

³ Ídem. Sección 5.3.

la realización de este examen. Si transcurriera dicho plazo sin que el solicitante hubiera pedido que se realice el examen, la solicitud caerá en abandono”.

En este sentido, dado que la solicitud no ha sido publicada y el solicitante **tampoco** ha solicitado que se realice el examen de patentabilidad, ni mucho menos se ha pagado la tasa para realizar dicho examen, respetuosamente considero que el Solicitante no debe pronunciarse sobre aspectos relacionados con la patentabilidad en respuesta al examen de forma, y por el contrario, sólo está en la obligación de responder a aquellas objeciones enmarcadas bajo el Artículo 38 de la Decisión 486.

5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su examen de forma han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de forma y proceda con el examen de fondo de acuerdo con el artículo 45 de la Decisión 486.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos: Capítulo Reivindicatorio Modificado;
 Capítulo Descriptivo Modificado;
 Recibo de pago por 11 reivindicaciones adicionales.

BIOCONJUGADOS DE POLIPÉPTIDOS DE APELINA SINTÉTICA

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado

- 5 electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII se creó el 26 de septiembre de 2014, se denomina PAT055781-WO-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 127.394 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden moléculas biológicas semi sintéticas que son bioconjugados de un polipéptido agonista de APJ y una fracción de extensión de vida media. En particular, los bioconjugados de la invención exhiben una mayor resistencia a la degradación proteolítica a través de la acción de peptidasas en comparación con su correspondiente polipéptido desnudo. La invención se refiere además a
- 15 métodos de preparación de dicha composición y el uso de dichas composiciones como agente farmacéuticamente activo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

FUDAMENTO DE LA INVENCION

- La incidencia de falla cardíaca en el mundo occidental es aproximadamente 1/100
- 20 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, con ello, el rendimiento 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
- 25 contractilidad cardíaca disminuye aún más. Hay aproximadamente 500K hospitalizaciones al año por "insuficiencia cardíaca 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
- 30 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
- 35 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 para el huérfano de la proteína G- receptor acoplado previamente (GPCR), APJ, también conocida como receptor apelina,- angiotensina- 1 como receptor, receptor de la angiotensina II- como- 1, 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 grandes dosis del péptido terapéutico de interés al paciente de modo que incluso si algún péptido terapéutico se degrada, quede 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 que tienen un elevado costo previsto inaceptable de tratamiento. 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 es más lenta mientras que todavía se mantiene la actividad biológica. Tales polipéptidos modificados sintéticamente han sido descritos en la solicitud de patente EE.UU. no publicada No 13/747,621 (PAT054961- US-

NP). Otro enfoque incluye la reducción de la tasa de depuración mediante la conjugación de péptidos con moléculas que impiden su eliminación a través del riñón. Tales bio- conjugados, sin embargo, pueden todavía ser susceptibles a la actividad de la proteasa.

5 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.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION:

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

15 Por lo tanto el objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos bioconjugados o multímeros de los mismos, que comprende a) un péptido o polipéptido que es útil como agonista APJ; y b) una fracción de extensión de vida media; en donde el péptido y la fracción de extensión de vida media están covalentemente unidas o fusionadas, opcionalmente a través de un enlazador.

20 El bioconjugado de la invención poseen al menos una de las siguientes mejoras con respecto a apelina tipo salvaje y otros análogos de apelina conocidos: vida media aumentada; mayor inmunidad a la degradación después de la administración y/o ante 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, son por lo tanto particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de
25 enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca, trastornos y afecciones asociadas con insuficiencia cardíaca, y trastornos y afecciones que responden a la activación de la actividad del receptor APJ.

30 En una realización, los bioconjugados de la invención 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 bioconjugados de la invención son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión

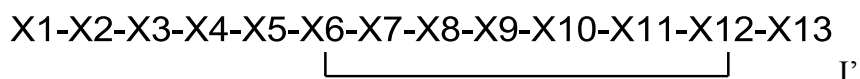
pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

La invención se refiere a bioconjugados de un péptido o polipéptido y una fracción de extensión de vida media, composiciones farmacéuticas de los mismos, y métodos de fabricación y uso de los mismos, como se describe en el presente documento.

Ejemplos de péptidos o polipéptidos que forman el bioconjugado incluyen el péptido y polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I a IX, o una amida, un éster o una sal del mismo, así como cualquier péptido o polipéptido enumerado específicamente en este documento, incluyendo, pero no limitado a los ejemplos experimentales.

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

- a. un péptido o un polipéptido de la fórmula (I') (SEQ ID NO:1):



en donde:

X1 es el extremo N del polipéptido y está ausente o se selecciona a partir de pE, R, I_{sn}, Q, A, K, y ácido 5- amino- valérico;

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

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

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

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

- X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado de C, c, hC, D- hC, K, D, Orn, Dab o E en el que la cadena lateral de X6 y X12 están unidos entre sí a través de un enlace covalente formando ya sea un monosulfuro (- S-), un disulfuro (- SS-) o un enlace amida (- NHC (O) - o- C (o)- NH-); o, alternativamente X6 es K, X13 está ausente y X12 es F o f en donde el extremo C- terminal de X12 forman un enlace de amida con la cadena lateral amino de X6;
- X7 es H, h, A, N- Me- A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E o cisteína en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;
- X8 es K, k, F, f, A, hF, N- Me- R, E o 4- amino- lsn;
- X9 es G, N- Me- G, A, D, L, R o Aib;
- X10 es P, A, p, 4- PhP o ácido pipecólico,
- X11 es M, D- Nle, Nle, N- Me- Nle, M(O), A, F, Y, L, K, 3- PyA o Cha; y
- X13 es el extremo C y está ausente o seleccionado a partir de F, f, N- Me- F, Nal, D- Nal, 3- Br- F, (S)- β - 3- F, I, A, a, K, Dap, H y E;
- en donde:
- Nle es L- norleucina;
- D- hC es D- homocisteína
- hC es L- homocisteína;
- hF es L- homofenilalanina;
- hK es L- lisina;
- Nal es L- nafatalina;
- Orn es ornitina;
- Aib es ácido α - aminoisobutírico;
- Dab es ácido (S)- diaminobutírico;
- Dap es ácido (S)- 2,3- diaminopropiónico;
- M(O) es metionina sulfona;
- Cha es (S)- β - ciclohexilalanina;
- 4- amino- lsn es ácido 4- aminopiperidina- 4- carboxílico;
- lsn es isonipecotinoilo;
- pE es ácido L- piroglutámico;
- 3- PyA es 3- (3- piridil)- L- alanina;

4- PhF es 4- Fenil- L- fenilalanina;

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

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

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.

10 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. Excepto cuando está precedido por “D,” el aminoácido es un aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayusculo, ésta se refiere al aminoácido L. Cuando la abreviatura de una letra es una letra
15 minuscula, ésta se refiere al aminoácido D.

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

La fracción de extensión de vida media de la invención puede ser covalentemente
25 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,
30 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 (ASH), o polipéptidos fijadores de albúmina. 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 Fórmula I', o sus formulas relacionadas (Fórmulas I- IX). En algunas formas de realización, 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), un ácido graso o polipéptidos 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 la Fórmula I', o I- IX. 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 la Fórmula I' o I- IX de la invención.

Los bioconjugados de la invención, a través de activación del receptor APJ, son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares

isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, 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.

5

En una forma de realización preferida, los bioconjugados de la invención son útiles en el tratamiento de insuficiencia cardíaca 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 bioconjugado de la invención, de tal manera que el trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ en el sujeto se trata.

En aún otra realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, que comprenden un bioconjugado de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En aún otra realización, la invención se refiere a combinaciones que incluyen, un bioconjugado de la invención, 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 bioconjugado de la invención.

Estos y otros aspectos del invento se explicarán en la siguiente descripción detallada del invento.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición

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 cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia

5 ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, 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.

10

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.

15

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

20 invención. Excepto cuando está precedido por "D," el aminoácido es un aminoácido L.

Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, ésta se refiere al aminoácido D. Cuando la abreviatura de una letra es una letra minúscula, 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 escribe desde el

25 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.

30

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 5 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 10 carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo de ácido graso ($C_qH_{q+1}C(O)_2H$ en donde q es 3 a 20), 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 15 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.

20 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 25 a sitio, se utilizan para fijar la fracción de extensión de vida media, 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, 30 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 - colesterol 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- colesterol 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 un 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.

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 (ácidos) 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 estereoisómeros D y L, si su estructura permite tales formas estereoisoméricas. 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), cisteína (C o Cys), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), fenilalanina (F o Phe), glicina (G o Gly), histidina (H o His), isoleucina (I o Ile), lisina (K o Lys), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), asparagina (N o Asn), prolina (P o Pro), glutamina (Q o Gln), arginina (R o Arg), serina (S o Ser), treonina (T o Thr), valina (V o Val), 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 Adelina 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.

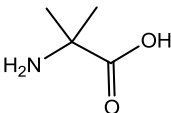
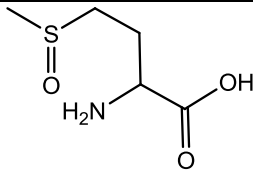
Además, se entiende que tales "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt modificada (RS) para su incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" pares son generados por un proceso de selección desarrollado por Schultz o por mutación 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, aunque se genera biosintéticamente, se incorpora en las proteínas por un par tRNA/tRNA sintetasa ortogonal "seleccionado".

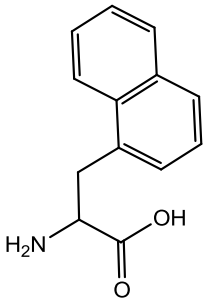
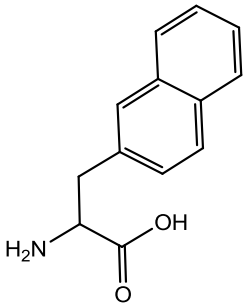
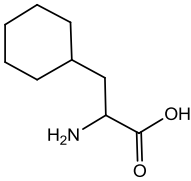
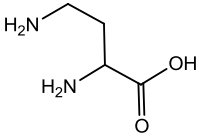
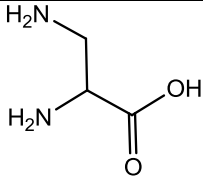
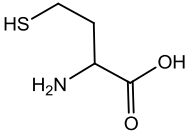
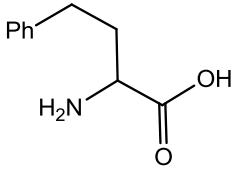
Los aminoácidos codificados modificados incluyen, pero no se limitan a, hidroxiprolina, γ - carboxiglutamato, O- fosfoserina, ácido azetidinacarboxílico, ácido 2- aminoadípico, ácido 3- aminoadípico, beta- alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2- amino- butírico, ácido 4- aminobutírico, ácido 6- aminocaproico, ácido 2- aminoheptanoico, ácido 2-

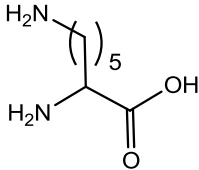
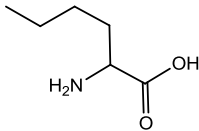
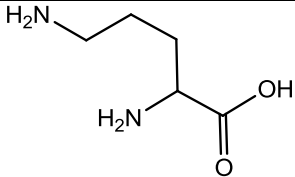
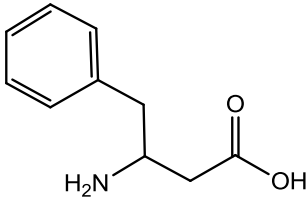
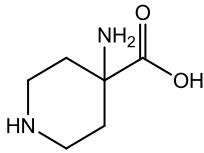
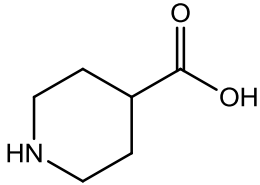
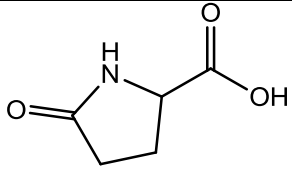
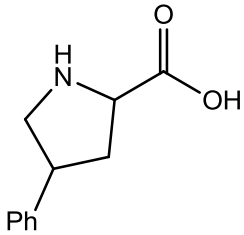
aminoisobutírico, ácido 3- aminoisobutírico, ácido 2- aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4- diaminoisobutírico, desmosina, 2,2' - diaminopimélico, ácido 2,3- diaminopropiónico, N- etilglicina, N- metilglicina, N- etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo- hidroxilisina, 3- hidroxiprolina, 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.

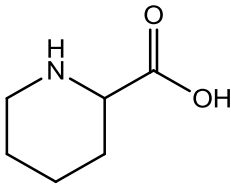
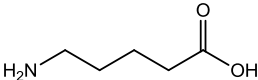
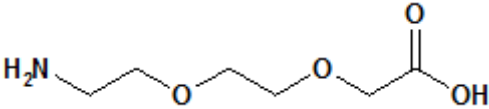
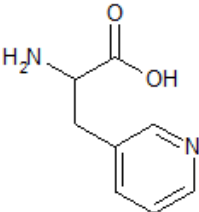
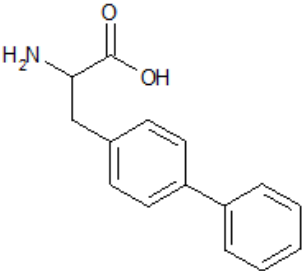
El término "análogo aminoácido," como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a manera de ejemplo solamente, un carbono- α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R. Análogos aminoácidos 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
Aib	Ácido α - aminoisobutírico	
M(O)	Metionina sulfona	

1- Nal	1- Naftalanina	
2- Nal	2- Naftalanina	
Cha	β - Ciclohexilalanina	
Dab	Ácido diaminobutírico	
Dap	Ácido 2,3- diamino propiónico	
hC	Homocisteina	
hF	Homofenilalanina	

hK	Homolisina	
Nle	Norleucina	
Orn	Ornitina	
β - 3- F	β - 3- fenilalanila	
4- amino- lsn	Ácido 4- Aminopiperidina- 4- carboxílico (el grupo 4 amino forma el enlace peptídico)	
lsn	Ácido isonipecotínico	
pE	Ácido piroglutámico	
4- PhP	4- Fenilprolina	

	Ácido pipecolínico	
	Ácido 5- aminovalérico	
O2Oc	Ácido 8- amino- 3,6- dioxaoctanoico	
3- PyA	3- (3- piridil)- alanina	
4- PhF	4- fenil- fenilalanina	

Nal se refiere tanto a 1- Naftalanina como a 2- Naftalanina, preferiblemente 2- naftalanina.

4- Fenilprolina se refiere tanto a cis como a trans 4- Fenilprolina, preferiblemente trans- 4- fenilprolina

5

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)NH₂, - C(O)NH- C₁₋₆ alquilo, - C(O)NH- C₁₋₂alquilfenilo, - C(O)NH- NHBn o - C(O)N(C₁₋₆ alquilo)₂).

El término “amida” también se refiere a un derivado del grupo amino en el extremo N
 10 (ej., - NHC(O)C₁₋₁₆alquilo, - NHC(O)(CH₂)_nPh (n es un entero de 1 a 6), - NHC(O)(CH₂)₂CO₂H, 4- Cl- Ph- (CH₂)₃C(O)NH-, C₁₁H₂₃C(O)NH- (CH₂)₂- O- (CH₂)₂- O- CH₂- C(O)- NH-, C₁₃H₂₇C(O)NH- (CH₂)₂- O- (CH₂)₂- O- CH₂- C(O)- NH- ; C₁₅H₂₇C(O)NH-

$(\text{CH}_2)_2\text{-O-}(\text{CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-C(O)NH-}$, $\text{Ph-CH}_2\text{CH}_2\text{NHC(O)-NH-}$ o $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{C(O)NH-}$ (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
 5 refiere a grupos alquilo C_{1-6} tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc., grupos cicloalquilo C_{3-8} tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos arilo C_{6-10} tales como fenilo, α -naftilo, etc., grupos aril C_{6-10} -alquilo C_{1-6} , por ejemplo grupos fenilalquilo- C_{1-2} 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
 10 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-
 15 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.

20

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
 25 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).

30 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 oligonucleótidos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136:355- 60, 1993) y comparte una homología significativa con el receptor de angiotensina II tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina II no se une a APJ. Aunque huérfano desde hace muchos años, el ligando endógeno ha sido aislado y nombrado apelina (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471- 6 (1998)).

El término "apelina", indica una preproteína 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 Pyr¹- apelina- 13. Diferentes formas de apelina "se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.492.324 B1.

30

El término "conjugado" y "bioconjugado" se utiliza indistintamente y se destina para referirse a la entidad formada como resultado de una unión covalente de un polipéptido

agonista de APJ o un polipéptido de fórmula I' o I- IX, y una fracción de extensión de vida, a través de un enlazador opcional. 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' o I- IX, y una fracción de extensión de vida media.

5

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), un ácido graso, un grupo de colesterol, 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 residuo tal 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 vida 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

5 aproximadamente de dos veces, pero un aumento más pequeño puede ser útil.

Péptidos o polipéptidos de la invención

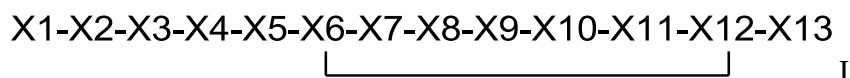
Varias realizaciones de la invención se describen en la presente. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características

10 especificadas para proporcionar realizaciones adicionales.

En la realización 1A, la invención proporciona además un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende:

a. un péptido o un polipéptido de la fórmula (I): (SEQ ID NO: 2)

15



en donde:

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

20

X2 es R, A, r, N- Me- R, K, H, hF, hK, o Orn;

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

X4 es R, A, r, N- Me- R o cisteina en donde la cadena lateral de la cistenina forma un enlace

25 de disulfuro con la cadena lateral de la cistenina en la posición X7;

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

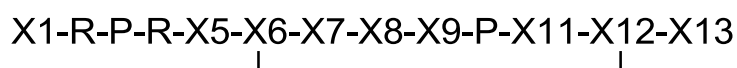
X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado a partir de C, c, hC, D- hC, K, D, Orn, Dab o E en donde la cadena lateral de X6 y X12 se enlazan a través de un enlace covalente;

- o alternativamente X6 es K, X13 está ausente y X12 es F o f en donde el extremo C de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral amino de X6;
- X7 es H, h, A, N- Me- A, a, Aib, K, Nal, F, P, Dap, N, E o cisteína en donde la cadena lateral de la cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición
- 5 X3 o con la cadena lateral de la cisteína en la posición X4;
- X8 es K, k, F, f, A, hF, N- Me- R o 4- amino- lsn;
- X9 es G, N- Me- G, A o Aib;
- X10 es P, A, p, 4- PhP o ácido pipercolico,
- X11 es M, D- Nle, Nle, N- Me- Nle, M(O), A, F, Y, L, K, o Cha; y
- 10 X13 es el extremo C y está ausente o seleccionado a partir de F, f, N- Me- F, Nal, D- Nal, 3- Br- F, (S)- β - 3- F, I, A, a, K, Dap en donde:
- Nle es L- norleucina;
- D- hC es D- homocisteína
- 15 hC es L- homocisteína;
- hF es L- homofenilalanina;
- hK es L- lisina;
- Nal es L- nafatalina;
- Orn es ornitina;
- 20 Aib es ácido α - aminoisobutírico;
- Dab es ácido (S)- diaminobutírico;
- Dap es ácido (S)- 2,3- diaminopropiónico;
- M(O) es metionina sulfona;
- Cha es (S)- β - ciclohexilalanina;
- 25 4- amino- lsn es ácido 4- aminopiperidina- 4- carboxílico;
- lsn es isonipecotinoilo;
- pE es ácido L- piroglutámico;
- en donde el extremo N y el extremo C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; y
- 30 o una amida, un éster o una sal de polipéptido, o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo; y
- b. una fracción de extensión de vida media; en donde

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

- a. un péptido o un polipéptido de acuerdo con la realización 1, 2 o 3, que tiene la Fórmula II (SEQ ID NO: 3):



II

10 en donde

X1 está ausente, pE, R, Q o Isn;

X5 es L o Cha;

X7 es H, Aib, F, K;

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

X13 es ausente o es F, f, K;

20 X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado a partir de C, K, D, Orn, Dab o E en donde la cadena lateral de X6 y X12 se enlazan a través de un enlace covalente; y

en donde el extremo N y el extremo C opcionalmente forma un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo;

25 a. una fracción de extensión de vida media y

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.

30 En aún un aspecto adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores, más específicamente de cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la

fórmula I, I' o II en la que X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado de C, K, D, Orn, Dab o E en donde la cadena lateral de X6 y X12 están unidos entre sí a través de un enlace covalente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a la misma; y una fracción de extensión de vida media; en el que dicho péptido o polipéptido y dicha fracción de extensión de vida media se une covalentemente o se fusiona opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 3, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que X6 y X12 se seleccionan independientemente entre K, Orn, Dab, e y D y en donde la cadena lateral de X6 y X12 forman juntos un enlace de amida; o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido; y una fracción de extensión de vida media, en donde dicho péptido o polipéptido y la fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados, opcionalmente a través de un enlazador. En una aspecto adicional de esta realización, X6 es K, Orn o Dab y X12 es E o D y la cadena lateral de X6 y X12 forma un enlace de amida. En otro aspecto de esta realización, X6 es K y X12 es E o D.

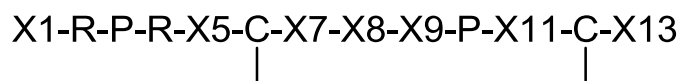
En la realización 4, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que X6 y X12 son independientemente C, c, D- hC or hC en donde la cadena lateral de X6 y X12 forman juntos un enlace de disulfuro; o una amida, un éster o una sal del péptido o polipéptido; y una fracción de extensión de vida media, en donde dicho péptido o polipéptido y la fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados, opcionalmente a través de un enlazador. En un aspecto adicional de esta realización, X6 y X12 son C.

En la realización 4A, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la fórmula I, I' o II, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, más específicamente de cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4, en donde X6 y X12 son independientemente C, c, D- HC o HC en el que la cadena lateral del X6 y X12 juntos forman un enlace monosulfuro (- S-); o una amida,

un éster o una sal del péptido o polipéptido; y una fracción de extensión de vida media, en donde dicho péptido o polipéptido y la fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados, opcionalmente a través de un enlazador. En un aspecto adicional de esta realización, X6 y X12 son C.

5

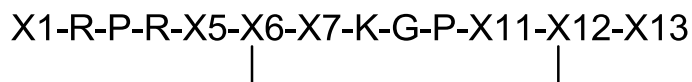
En la realización 5, ciertos bioconjugados de la invención comprenden un péptido o polipéptido, según cualquier realización 1, 2, 4, 4A y 4B, que tienen la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



III;

10 o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En la realización 5A, la invención se refiere a un bioconjugado o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la fórmula III en la que la cisteína en la posición 6 y 12 forma un enlace de disulfuro (- SS-), un enlace de monosulfuro (- S-). En un aspecto adicional de la realización 5 ó 5A, la invención incluye un bioconjugado o un multímero del mismo que comprende un péptido o polipéptido
15 de la fórmula III en donde las 2 cisteínas en posición 6 y 12 forman un enlace disulfuro (- SS-).

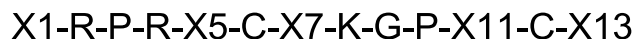
En la realización 6, ciertos bioconjugados, o multímeros de los mismos, comprenden un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1- 5 que tiene la fórmula
20 IV (SEQ ID NO: 5):



IV;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido, para la conjugación con la fracción de extensión de vida media.

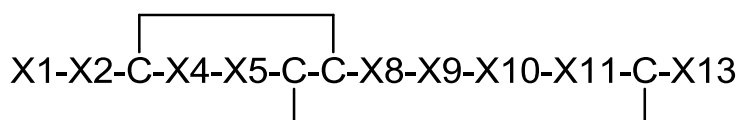
25 En la realización 7, ciertos bioconjugados, o multímeros de los mismos, comprenden un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1, 2 y 4 a 6 que tiene la fórmula V (SEQ ID NO: 6):



V;

o una amida, un éster o una sal del polipéptido, para la conjugación con la fracción de extensión de vida media. En la realización 7A, la invención se refiere a un bioconjugado, un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la fórmula V en donde las 2 cisteínas en la posición 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (- SS-), un enlace de monosulfuro (- S-). En un aspecto adicional de la realización 7 o 7A, la invención incluye bioconjugados que comprende un péptido o polipéptido de la Fórmula V en donde las 2 cisteínas en la posición 6 y 12 forman un enlace de disulfuro (- S- S-), para conjugación con la fracción de extensión de vida media.

En la realización 8, la invención se refiere a un bioconjugado que comprende un péptido bicíclico o polipéptido de la fórmula I o I' en donde X3 es cisteína y en donde la cadena lateral de cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7, y una fracción de extensión de vida media en el que dicho péptido y dicha fracción de extensión de vida se une covalentemente o se fusiona, opcionalmente a través de un enlazador. Esta forma de realización está representada por un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la Fórmula VI (SEQ ID NO: 7):

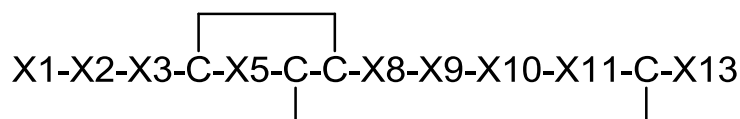


VI

o una amida, un éster o una sal del polipéptido para la conjugación con la fracción de extensión de vida media.

En la realización 9, la invención se refiere a un bioconjugado que comprende un péptido bicíclico o polipéptido de la fórmula I o I' en donde X4 es cisteína y en donde la cadena lateral de cisteína forma un enlace de disulfuro con la cadena lateral de la cisteína en la posición X7, y una fracción de extensión de vida media en el que dicho péptido y dicha

fracción de extensión de vida se une covalentemente o se fusiona, opcionalmente a través de un enlazador. Esta forma de realización está representada por un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de la Fórmula VII (SEQ ID NO: 8):

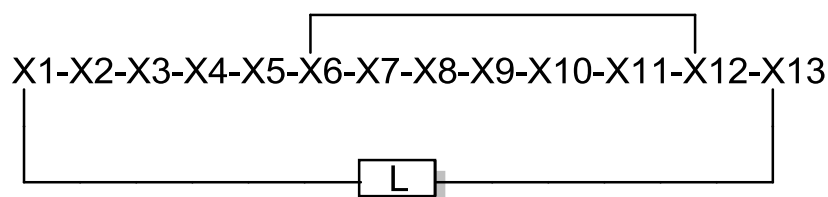


5

VII

o una amida, un éster o una sal del polipéptido, para la conjugación con la fracción de extensión de vida media.

En la realización 10, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de una cualquiera de las Fórmulas I a V, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 7; en donde el extremo N- terminal y el extremo C- terminal forman opcionalmente un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente a la misma y una fracción de extensión de vida media, en donde dicho péptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados, opcionalmente a través de un enlazador. Esta realización es representada por péptidos o polipéptidos de la Fórmula VIII (SEQ ID NO: 9):

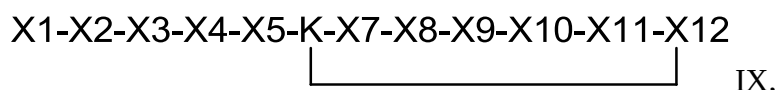


VIII

en donde L es (G)r, G es glicina y r es 1, 2, 3 o 4; o una sal del polipéptido. En esta realización, la fracción de extensión de vida media está unida, opcionalmente a través de un ligador, a un grupo funcional de una cadena lateral (por ejemplo, a un grupo amino en la cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4- amino- Isn).

En la realización 10A, un aspecto adicional de la realización 10, la invención se refiere al péptido o polipéptido de la Fórmula VIII para la conjugación con la fracción de extensión de vida media en la que X1 es Q, X13 es F y r es 2 o un éster, una amida o un sal del mismo;

- 5 En la realización 11, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o polipéptido de acuerdo con la Fórmula I o I', según la realización 1 o 2, en donde X6 es K, X13 está ausente y X12 es F o f en el que el extremo C-terminal de X12 forma un enlace amida con la cadena lateral amino de X6, y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media son
10 unidos o fusionados covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador. Esta realización es representada por un péptido o polipéptido de la Fórmula IX (SEQ ID NO: 10):



- o un éster, una amida, o una sal del polipéptido, para la conjugación con la fracción de extensión de vida media. En un aspecto particular de esta forma de realización, el péptido de
15 la Fórmula IX se une preferentemente a través de su extremo N- terminal, opcionalmente a través de un enlazador, a la fracción de extensión de vida media.

- Cualquiera de los residuos aminoácidos listados anteriormente o a continuación de la Fórmula I', o sus fórmulas relacionadas y todas las realizaciones descritas en la presente, ej.,
20 Fórmulas I, II a IX, pueden sustituirse en una forma 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 aminoácidos conservadoras permisibles se explican adicionalmente en la presente.

- 25 Las siguientes realizaciones pueden utilizarse independientemente, colectivamente o en cualquier combinación o sub- combinación:

- En la realización 12, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las
30 fórmulas I', I a VII y IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 9 y 11) o una amida, un éster o una

sal del mismo, en donde X1 es pE. En un aspecto de esta invención, la fracción de extensión de vida media está unida, opcionalmente a través de un enlazador al extremo C- terminal del péptido. En otro aspecto de esta invención, la fracción de extensión de vida media está unida, opcionalmente a través de un enlazador, a un grupo funcional de cadena lateral del péptido, tales como por ejemplo la funcionalidad de aminoácidos de una cadena lateral de K, Orn, Dab, Dap, hK o 4- amino- lsn. Un aminoácido de cadena lateral de particular interés para unir el péptido a la fracción de extensión de vida media es lisina en la posición 8 (X8 es K).

En la realización 12A, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas I', I a VII y IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 9 y 11) o una amida, un éster o una sal del mismo, en donde X1 es A o Q. En un aspecto adicional de esta realización, el péptido está fusionado o unido covalentemente a la fracción de extensión de vida media a través de extremo A o Q N.

En la realización 13A, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I a VII, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 9), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X13 es F; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

En la realización 13B, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Fórmulas I a VII, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 9), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X13 está ausente; o una amida, un éster o una sal del polipéptido. En la realización 13C, un aspecto de la realización 13B, el extremo C es una amida. En la realización 13D, un aspecto adicional de la realización 13C, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido según cualquiera de las Fórmulas I a VII, o cualquiera de otras clases y subclases descritas anteriormente, o una amida, un éster o una sal del mismo, en donde el extremo C es una

amida de la Fórmula $-C(O)R^2$ y R^2 es $-NH_2$, $-NH-Me$, $-NH-NHBn$, o $-NH-(CH_2)_2-Ph$. En un aspecto preferido de la realización 13D, la invención se refiere a un bioconjugado que comprende un péptido o un polipéptido según cualquiera de las Fórmulas I a VII, o cualquiera de otras clases y subclases descritas anteriormente, o una amida, un éster o una sal del mismo, en donde el extremo C es una amida de la Fórmula $-C(O)R^2$ y R^2 es $-NH-(CH_2)_2-Ph$.

En la realización 14, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 12), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X5 es L y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 15, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a V, VIII y IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 7 y 10- 14), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X7 es H y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 16, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a III y VI a IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas supra, (es decir, según cualquiera de las realizaciones 1 a 15), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X8 es K o F. En un aspecto adicional de esta forma de realización, X8 es K, y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media se unen o fusionan covalentemente, opcionalmente a través de un enlazador.

30

En la realización 17, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I

a III y VI a IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 16), o una amida, un éster o una sal del mismo, en el que X9 es G y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados

5 opcionalmente a través de un enlazador.

En la realización 18, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IX, o cualquiera de las otras clases y subclases descritas anteriormente, (es decir, de acuerdo a cualquiera de las realizaciones 1 a 17), o una amida, un éster o una sal del mismo, en donde X11 es Nle y una fracción de extensión de vida media, en el que dicho péptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados opcionalmente a través de un enlazador.

15 En la realización 18A, la invención se refiere a un bioconjugado, o un multímero del mismo, que comprende un péptido o un polipéptido de la realización 1, 2 o 3, en donde tres de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr- 1- apelina- 13. En una realización 18B, la invención se refiere a un bioconjugado que comprende un péptido o un polipéptido de la realización 1, 2 o 3, en donde cuatro de los aminoácidos X1 a X13 son diferentes de los aminoácidos correspondientes presentes en Pyr- 20 1- apelina- 13.

En otra realización, los aminoácidos X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, Los aminoácidos X9, X10, X11, X12 y X13, enlazador y fracciones de extensión de vida media son aquellos definidos por X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8. Los aminoácidos X9, X10, X11, X12 y X13, enlazador y fracción de extensión de vida media en la sección de Ejemplos a 25 continuación.

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

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

Los bioconjugados de la invención también incluyen bioconjugados que contienen péptidos y polipéptidos que son al menos 95% idénticos a los péptidos y polipéptidos según cualquiera de las Fórmulas I’, I a IX, 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, preferiblemente al menos 100 min 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, delección, 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 L- aminoácido con un D- aminoácido, u otra variación incluyendo, pero no limitado a, fosforilación, carboxilación, alquilación y similares, siempre y cuando la actividad agonista APJ del péptido o polipéptido de las Fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII o IX se mantiene y la estabilidad del plasma se mejora sobre la forma piroglutamada de apelina- 13. Por ejemplo, los aminoácidos D son bien tolerados con respecto a la actividad y estabilidad del polipéptido en la posición 2 (X2), posición 3 (X3), posiciones 5, 6, 7 y 8 (X5, X6, X7 y X8), posición 10 (X10) y la posición 13 (X13) de los péptidos cíclicos y polipéptidos de las Fórmulas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII o IX.

En una realización, la fracción de extensión de vida media está unida covalentemente o fusionada al extremo N del péptido de la fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I o VII y IX, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En otra realización, la fracción de extensión de vida media está unida covalentemente o fusionada al extremo C del péptido de la fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I o IX, opcionalmente a través de una fracción enlazadora.

En aún otra realización, la fracción de extensión de vida media está covalentemente
5 unida o fusionada a una cadena lateral del péptido de la Fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I o IX, por ejemplo, la vida media está unida 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' o cualquiera de las Fórmulas I- IX, opcionalmente a través de una fracción
10 enlazadora.

Fracción de Extensión de Vida Media

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
15 de extensión de vida media puede ser, por ejemplo, un polímero, tal como polietilenglicol (PEG), un ácido graso, un grupo de colesterol, 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)
20 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 (ASH), ácido graso o polipéptidos fijadores de albúmina. 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.

25

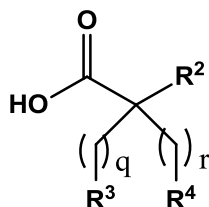
Las fracciones de extensión de vida media incluyen albúmina, que se refiere a la proteína más abundante en el plasma sanguíneo que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 65 y 67 kilodaltons en su forma monomérica, dependiendo de la especie de origen. El término "albúmina" se usa indistintamente con "albúmina de suero" y no
30 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 químicamente 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.

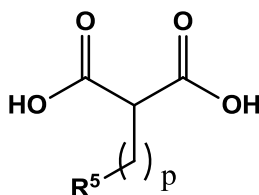
5

Las fracciones de extensión de vida media incluyen ácidos grasos, que pueden ser definidos como un alquilo C6- 70, un alqueno C6- 70 o una cadena de alqueno 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:

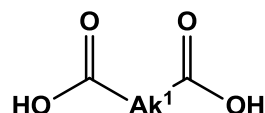
10



A1



A2



O A3

R² es CO₂H, H;

R³, R⁴ y R⁵ son independientemente de cada uno de los demás H, OH, CO₂H, - CH=CH₂ o - C≡CH;

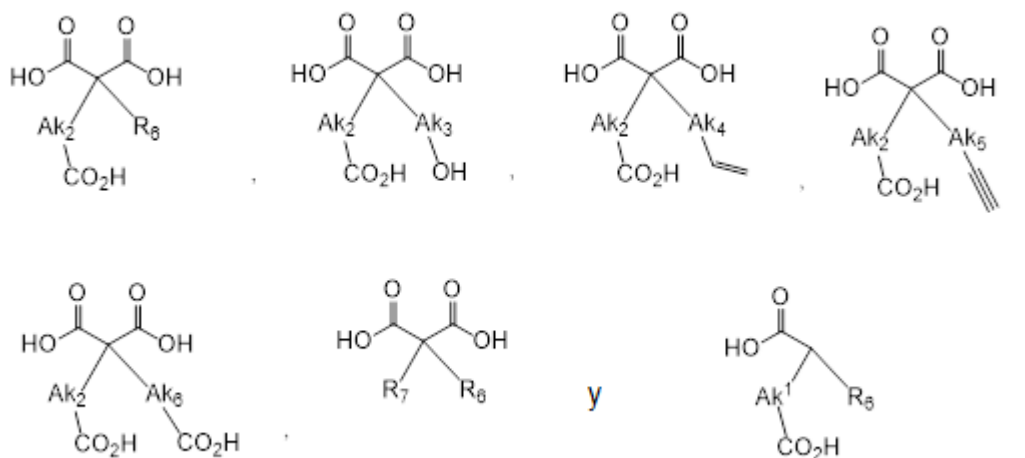
15

Ak¹ es un alqueno 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.

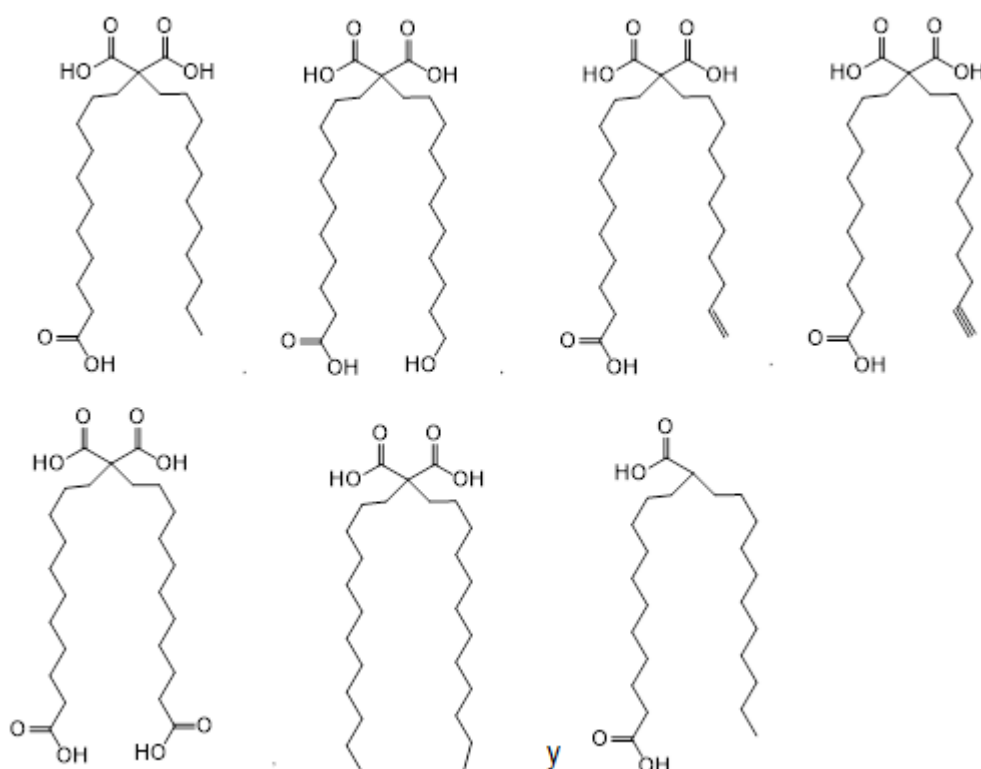
Ejemplos de ácidos grasos se seleccionan a partir de:

- 36 -



en donde Ak^2 , Ak^3 , Ak^4 , Ak^5 y Ak^6 son independientemente un (C₈₋₂₀)alquileo, R^6 y R^7 son independientemente alquilo(C₈₋₂₀).

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



Estas fracciones de ácidos de ácidos grasos se han descrito en la solicitud co- presentada, número de expediente PAT055274- 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 dimericas 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, dimerica, 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
5 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- IX a través de, por
10 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.
15 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, IgG1,
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 débil. Hessel et al. 2007 Nature 449:101- 104. Modificaciones
20 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
25 se puede fusionar con dos cadenas de polipéptidos de la Fórmula I'.

Enlazador

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

30 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.

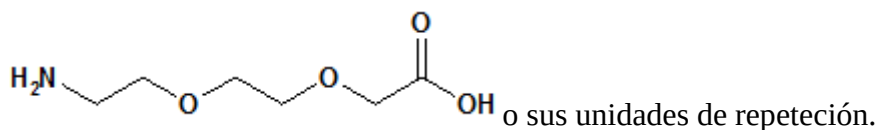
El enlazador puede estar formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En algunas realizaciones de la presente invención, el enlazador se compone de 1 a 20

5 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, cisteína y lisina. En algunas realizaciones, un enlazador está formado por una mayoría de aminoácidos que son estéricamente impedidos, tales como glicina y alanina. En
10 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*
15 *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 PAT055418- US- PSP2, PAT056274- US- PSP y 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
20 ID NO: 11), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12), GGGGS (SEQ ID NO. 13), 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
25 *and internal loop labeling of proteins using sortase- mediated reactions", Nature protocols, vol 8, No 9, 2013, 1787- 1799)*

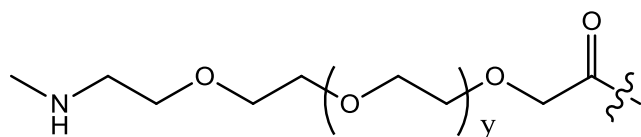
En otras formas de realización, el enlazador comprende de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan a partir de aminoácidos no naturales. Aunque se prefiere un enlazador de 3- 15 residuos de aminoácidos para la conjugación con la fracción de extensión de vida media, la
30 presente invención contempla enlazadores de cualquier longitud o composición. Un enlazador de aminoácidos no natural preferido es O2Oc de la siguiente fórmula:



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.

- 5 La porción enlazadora del enlazador puede comprender uno o más grupos alquilo, grupos alcoxilo, grupos alqueniilo, grupos cicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo y grupos heterocíclicos o combinación de los mismos. Por ejemplo, se pueden utilizar enlazadores alquilo tales como - NH- (CH₂)_zC(O)- o - S- (CH₂)_z- C(O) – o - O- (CH₂)_z- C(O) - en donde z es 2- 20. Estos enlazadores de alquilo pueden además sustituirse por cualquier
- 10 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
- 15 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
- 20 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,
- 25 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 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
 5 tales como por ejemplo unidad de (O₂Oc) o glicina o serina, alquileo C1- 4- C (O) - ,
 alquileo C1- 4,- NH- alquileo C2- 6 - NH- o unidades de NH CH₂CH₂ CH₂CH₂- 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
 10 piridina- 2- ildisulfanilo.

Preparación del péptido o polipéptido y constructo péptido- enlazador para la conjugación:

15 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
 20 polipéptidos o constructo- péptido 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,
 25 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 and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965,

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

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

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

10 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
15 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-
20 hidroximetilmetilfenilacetamidometilo, 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
25 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
30 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

5 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

10 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

15 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

20 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,

25 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

30 incluye bencilo, tetrahidropiranilo, y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina incluye Bzl, Cl₂- 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 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 la 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

5 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 α - carboxilo del aminoácido C- terminal se condensa con un alcohol deseado para proporcionar un éster de

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

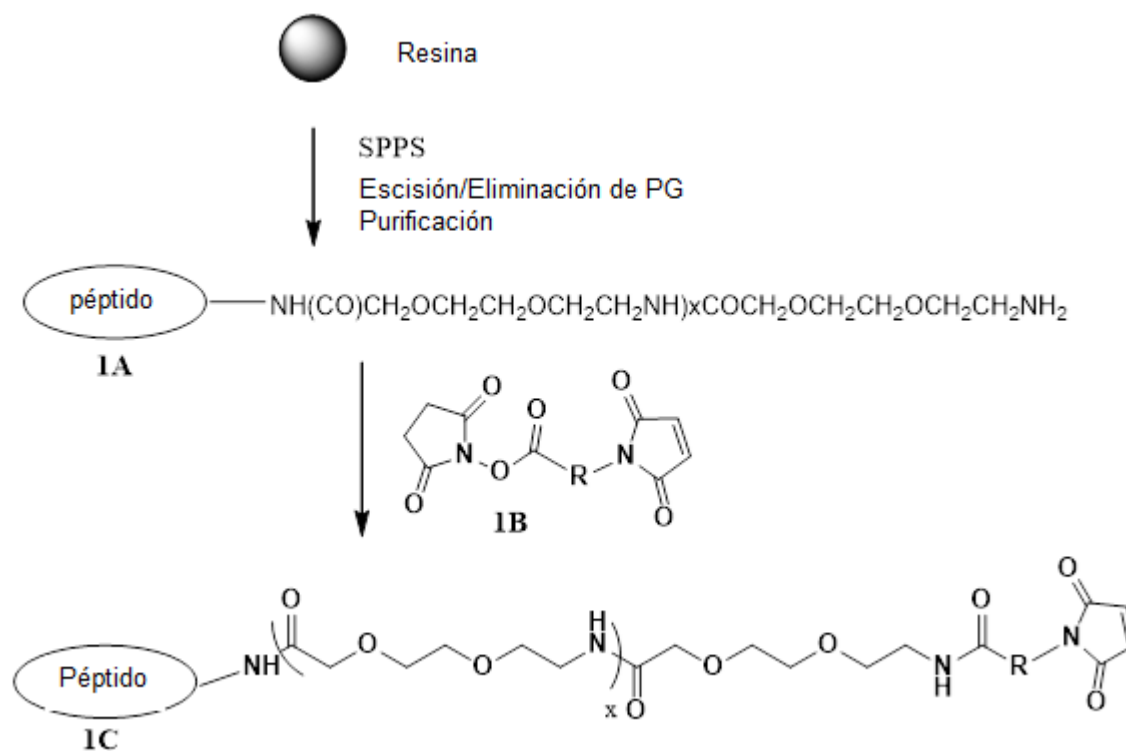
- 5 con los que los grupos reactivos en péptidos o polipéptidos modificados son capaces de reaccionar con para formar enlaces covalentes. Funcionalidades incluyen grupos hidroxilo para la unión con entidades éster- reactivas, grupos tiol para reaccionar con maleimidias, grupos que contienen maleimido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

10

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

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

15

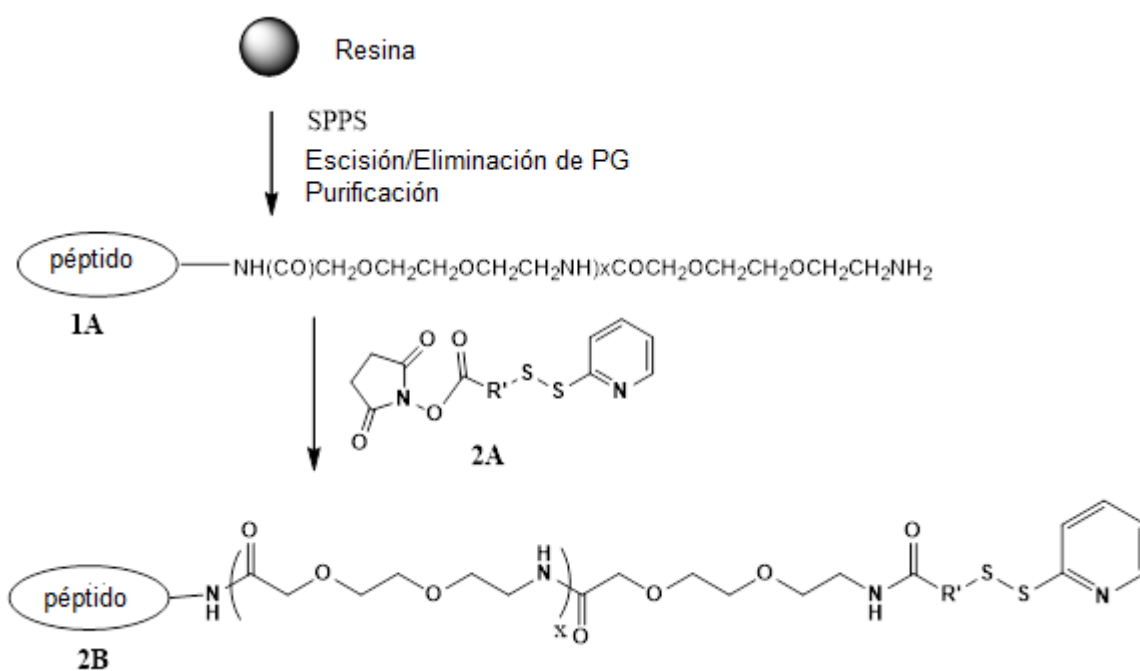


Esquema 1

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 alquileo 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 alquileo lineal, y más preferiblemente R es- CH₂- CH₂- .

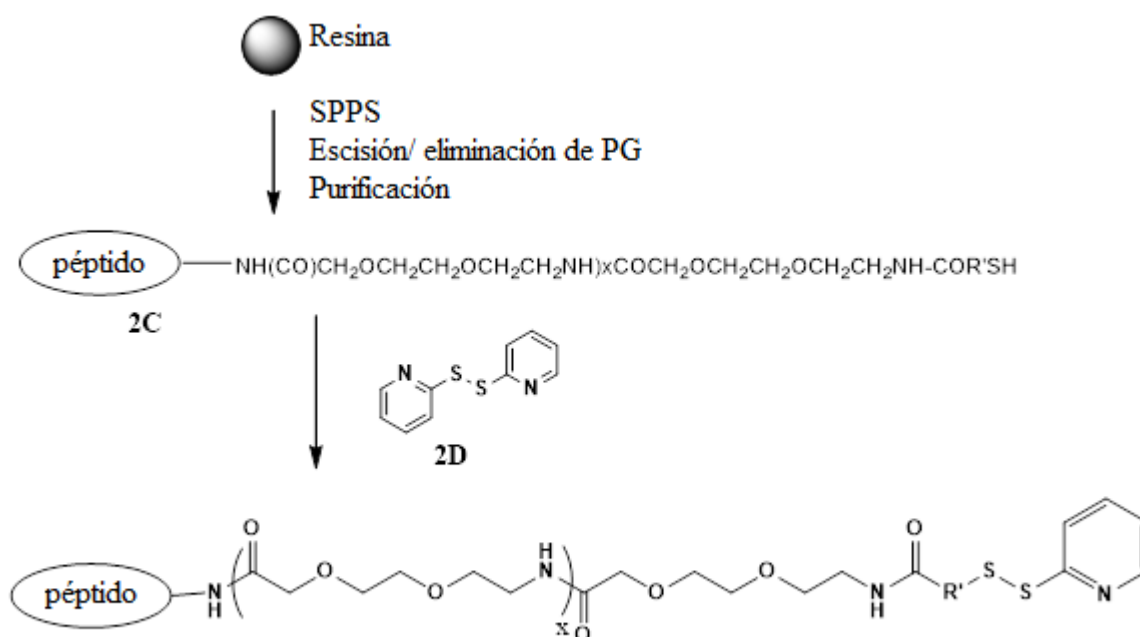
Alternativamente, para los péptidos que contienen una funcionalidad amino en la cadena lateral (por ejemplo péptido que contiene una lisina), grupo protector ortogonal tal como Alloc se requiere antes de la reacción de acoplamiento, seguido por el paso de desprotección adicional con el fin de obtener (1C).

Esquema 2A y 2B describen la síntesis de piridina- 2- il- disulfanilo que contiene enlazador unido al extremo N- terminal de un polipéptido agonista de APJ o un polipéptido de la Fórmula I a IX.



Esquema 2A

- 48 -



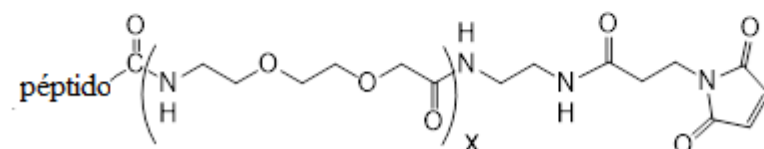
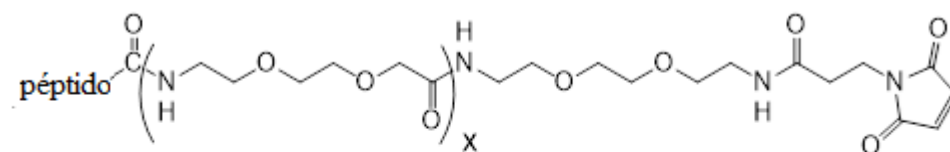
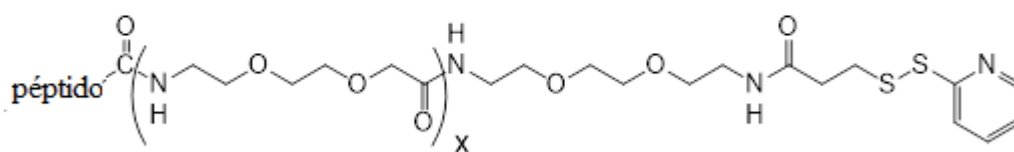
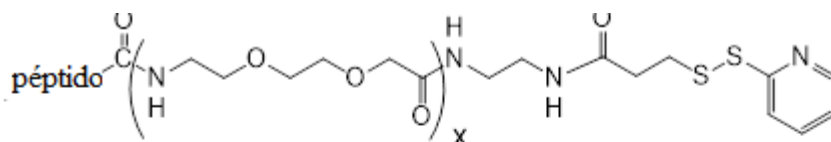
Esquema 2B

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 donde R' es un alquileo 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- CH₂- CH₂- . Alternativamente, el constructo de péptido- enlazador (2C) se puede preparar usando HO₂C- R'- SH, o una forma protegida del mismo (por ejemplo, grupos tritilo o Acn, 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). Similar al Esquema 1, el grupo funcional ortogonal (tal como el grupo amino de lisina) la protección puede ser requerida antes del acoplamiento de las reacciones.

Grupos funcionales 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

- 49 -

ejemplo $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$ o $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH-}$. Ejemplos no limitantes de tales constructos péptido- enlazador son:

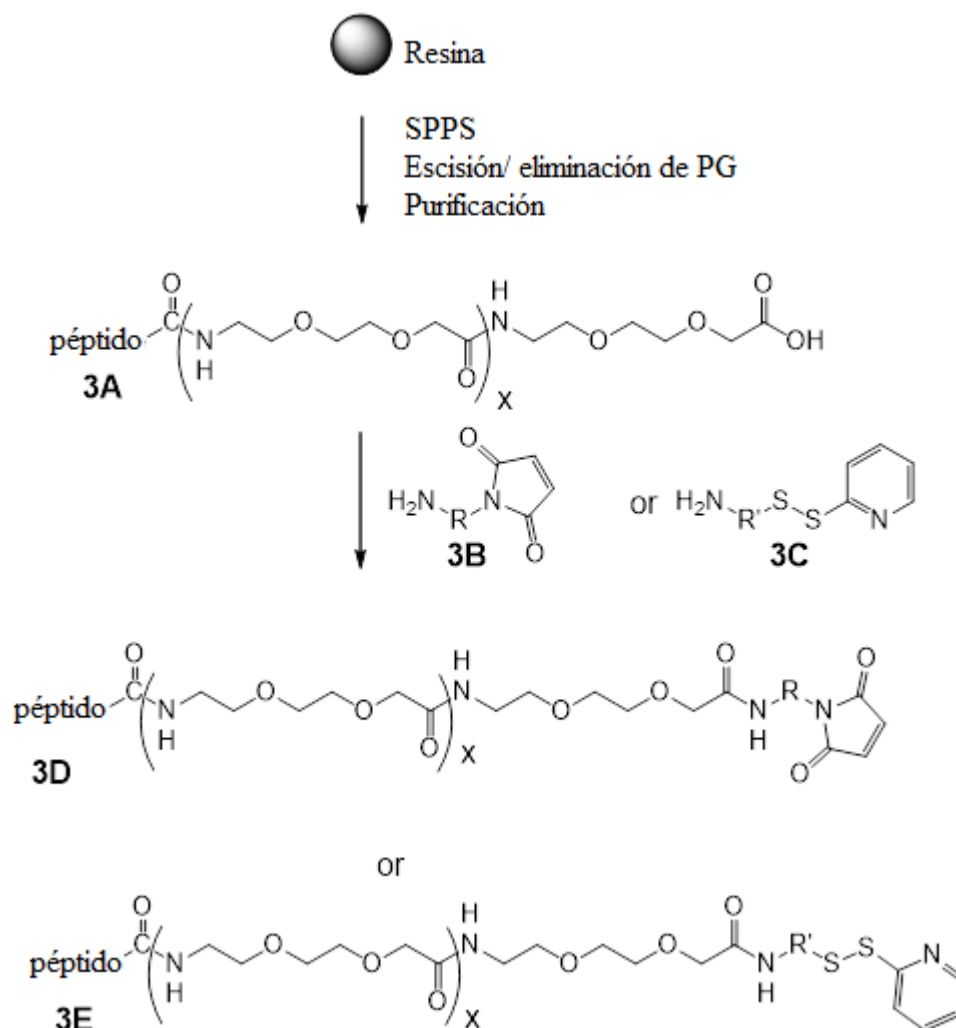


5

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

10

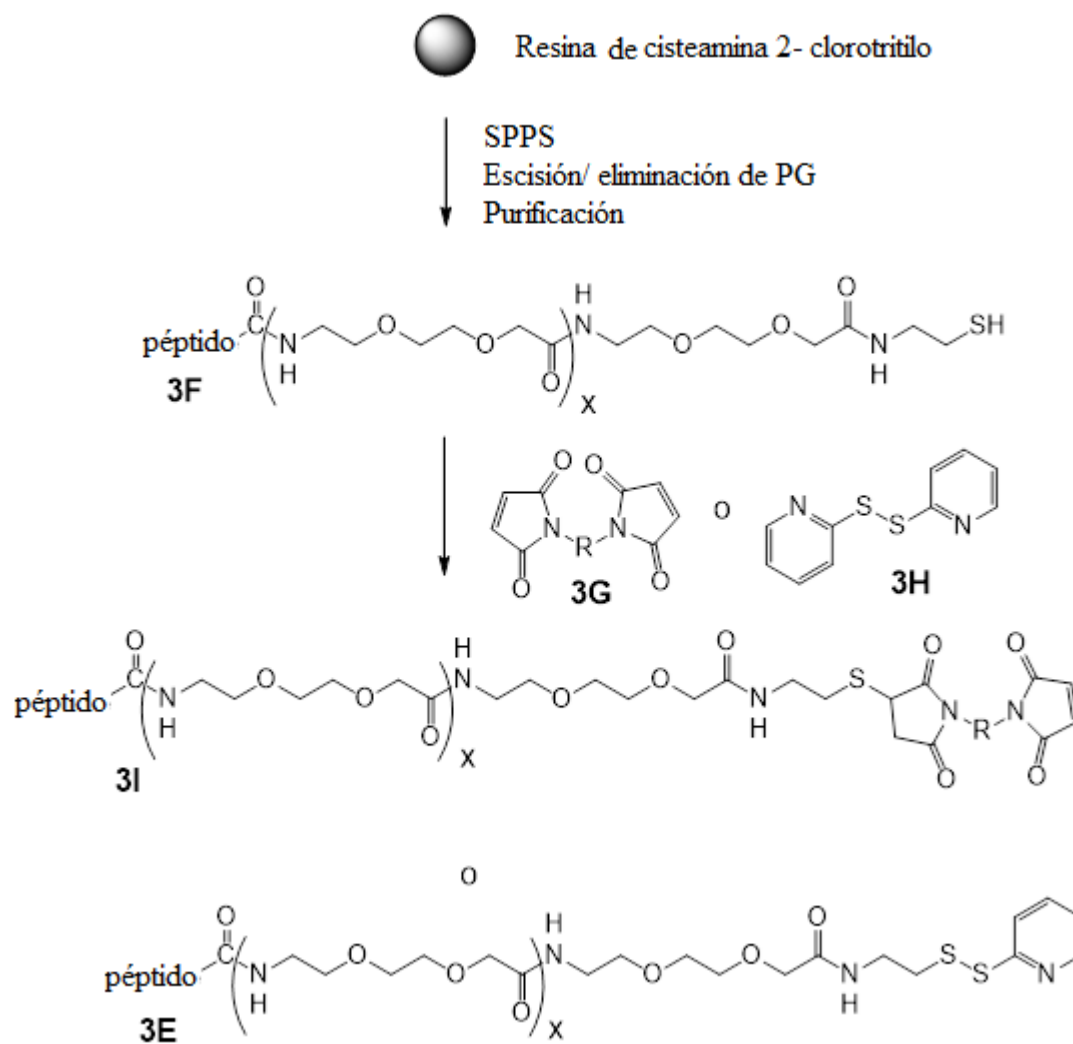
- 50 -



Esquema 3A

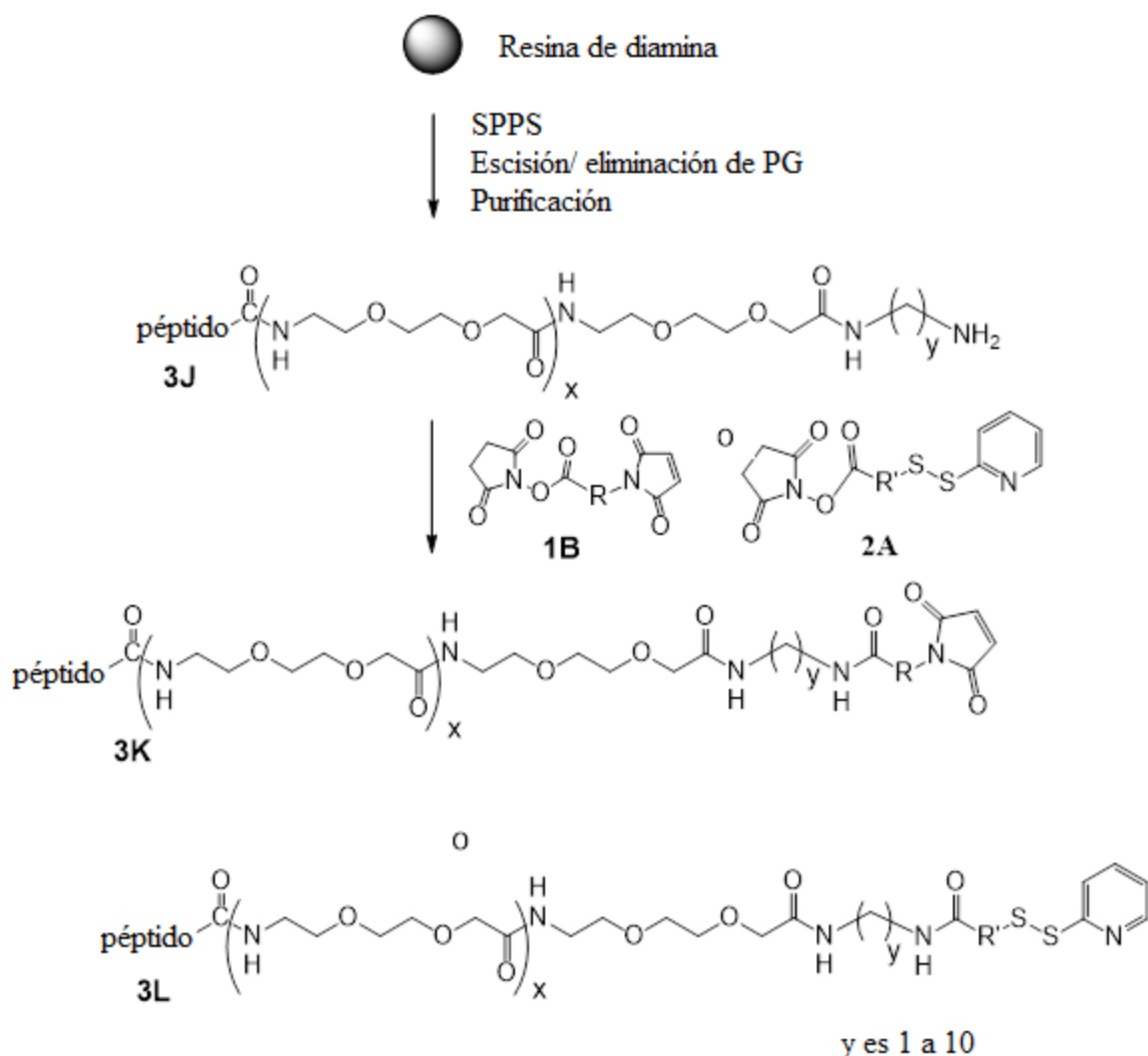
El grupo de ácido carboxílico en el extremo C- terminal del péptido se acopla con una o más unidades de aminoácidos O2Oc utilizando condiciones de acoplamiento de amida estándar

- 5 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.

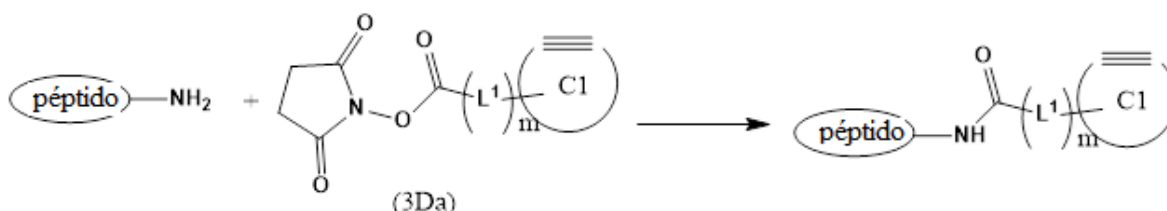


Esquema 3C

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 (4K) o (4L), respectivamente. Cuando el péptido contiene funcionalidades amino en su cadena lateral (por ejemplo, Lisina), alguien con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que la protección ortogonal adicional y pasos de desprotección se necesitan.

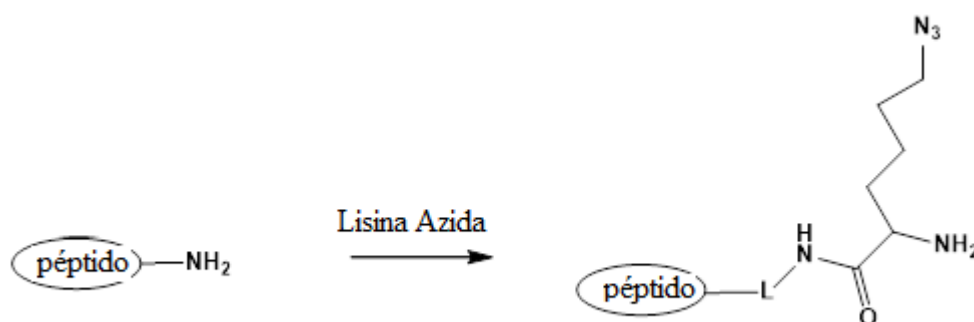
- Los Esquemas 1 a 3C describen constructos péptido- enlazador, más particularmente para su uso en la preparación de un bioconjugado con albúmina. El grupo reactivo de maleimida y el grupo reactivo de piridina- 2- il- disulfanilo reacciona con la funcionalidad SH de la cisteína 34 de la albúmina.

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.



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, L¹ es un enlazador de alquileo C1- C20 en el que la cadena de alquileo 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). El clic de manipulación puede ser introducido en el extremo N- terminal del péptido o en una cadena lateral de residuos de lisina.

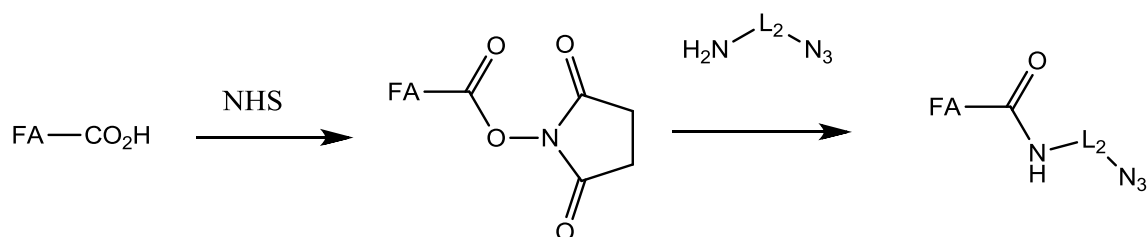


Esquema 3E

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 de degradación química. Ejemplos específicos se han descrito en esta solicitud co- presentada, (Número de expediente PAT055418- US- PSP2).

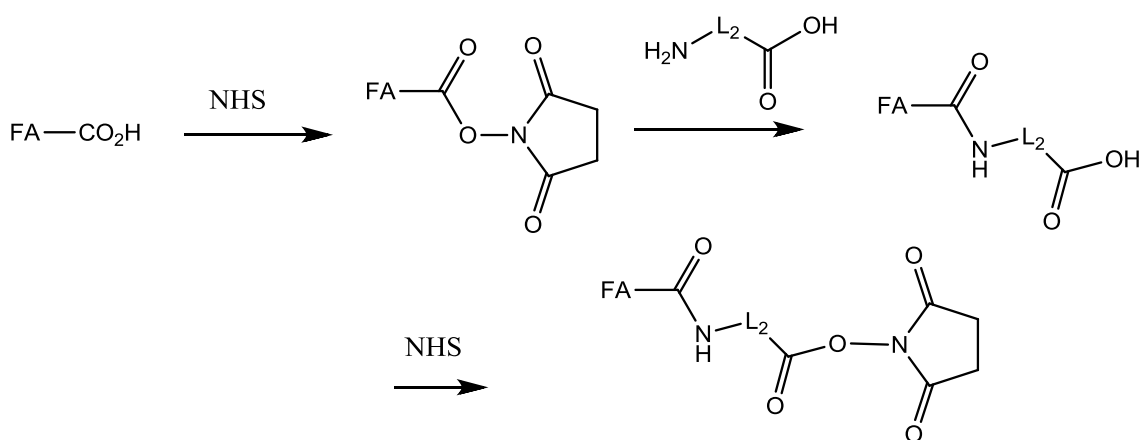
Preparación de constructo fracción- enlazador de extensión de vida media:

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



Esquema 3F

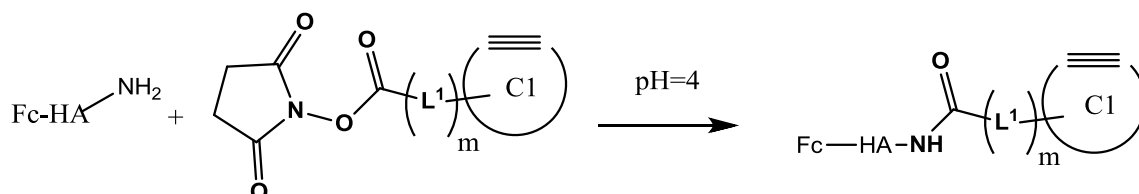
- 5 en donde FA es ácido graso, L2 es una fracción enlazadora (por ejemplo PEG), NHS es N-hidroxisuccinimida. Tales constructos de ácido graso- enlazador se utilizan para la conjugación utilizando química click. En los casos en donde el ácido graso contiene funcionalidades tales como grupos hidroxilo 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 (número de expediente PAT056275- US- PSP y 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- LPETGGLEVLFGQP (SEQ ID NO: 14) en donde el fragmento GGLEVLFGQP (SEQ ID NO: 15) 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 (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
5 expresión procariota y eucariota o el uso de métodos de presentación de fagos.

Los constructos Fc- enlazador tales como Fc- [GGGGS] (SEQ ID NO: 13), Fc- [GGGGS]2 (SEQ ID NO: 12), Fc- [GGGGS]3 (SEQ ID NO: 11), Fc- GG y Fc- GS, se describen a continuación en la parte experimental. El [GGGGS] (SEQ ID NO:13), [GGGGS]2
10 (SEQ ID NO: 12), [GGGGS]3 (SEQ ID NO: 11), 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.

15 **Conjugados**

En una realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I a IX se conjuga (se fija químicamente / covalentemente) a la funcionalidad tiol de la cisteína 34 de la albúmina.

20 En otra realización de la presente invención, un péptido o polipéptido de la Fórmula I' o cualquiera de las Fórmulas I- IX 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,
25 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).

30 En una realización, el péptido- Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo N del péptido. Alternativamente, el péptido- Fc se refiere a un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al extremo C del péptido.

Realizaciones preferidas de la invención son conjugados FC- péptido que comprenden un péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I', I- IX, como se define en la presente. En un aspecto de esta realización, el Fc- péptido es un bioconjugado en el que la secuencia Fc se fusiona al polipéptido o péptido de cualquiera de las Fórmulas I' - IX.

5

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.

10

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.

15

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 invención a través de un enlazador. En un aspecto de esta invención, el enlazador tiene la siguiente fórmula:

20

- [GGGGS] n-, n es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO:16) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido de cualquiera de las fórmulas I y III o IX contiene aminoácidos de origen natural. Ejemplos de polipéptidos de la invención adecuados para la fusión con el dominio Fc son: Q-R- P- R- L- C*- H- K- G- P- M- C*- F (SEQ ID NO: 17), Q- R- P- R- L- C*- H- K- G- P- M- C* (SEQ ID NO: 18) y Q- R- P- R- L- S- H- K- G- P- M- P- F (SEQ ID NO:19).

25

Realizaciones preferidas de la invención son bioconjugados fusionados con péptidos Fc como se definió anteriormente, que comprenden un fragmento (por ejemplo, un FcLALA) y un péptido o polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I' - I- IX, como se definió anteriormente. En aún otra realización, la invención se refiere a un bioconjugado según cualquiera de las realizaciones anteriores en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc modificado en donde la Lisina del extremo C ha sido eliminada o reemplazada con Alanina. Ejemplos representativos de esta realización son los ejemplos 9, 10, 15 y 16. Tales variantes

30

Fc han generado variantes de proteínas de fusión más estables con el péptido/polipéptido de Apelina.

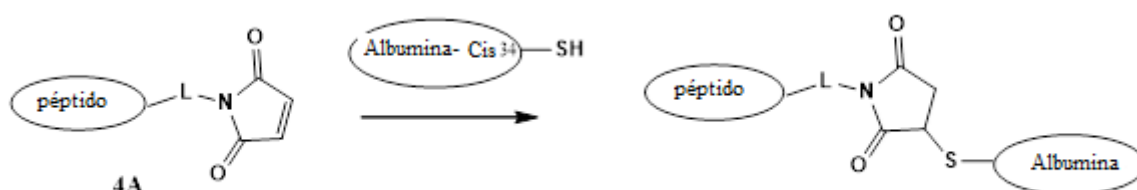
Se ha encontrado que los péptidos fusionados a una región Fc exhiben una vida media sustancialmente mayor in vivo que sus contrapartes sin fusionar. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido.

En otras realizaciones de la invención están los bioconjugados que comprende un péptido o polipéptido de acuerdo con las Fórmulas I- IX 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 IX 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 de Suero Humano

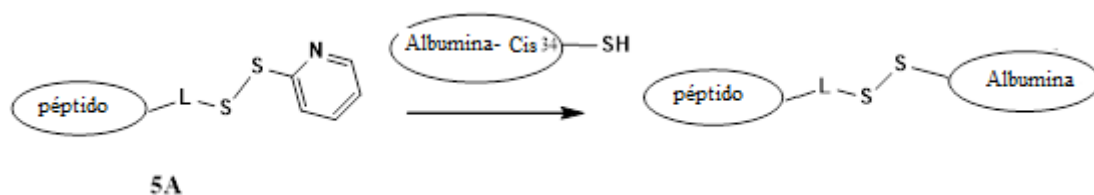


Esquema 4

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 5A con cisteína 34 de albúmina

- 59 -



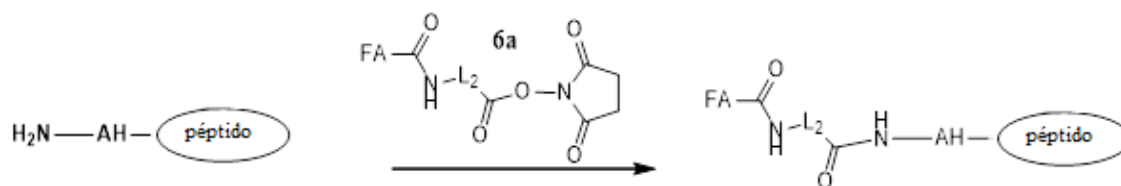
Esquema 5

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

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-
 10 presentadas (números de expediente: PAT055326- US- PSP3), que se incorpora en la presente como referencia.

Otro método de conjugación se ha descrito en la solicitud co- pendiente y co- presentada (
 15 números de expediente PAT056274- US- PSP, PAT056275- US- PSP y PAT055418- US- PSP).

Tal método incluye N- acilación selectiva de un péptido y se resume en el Esquema 6.

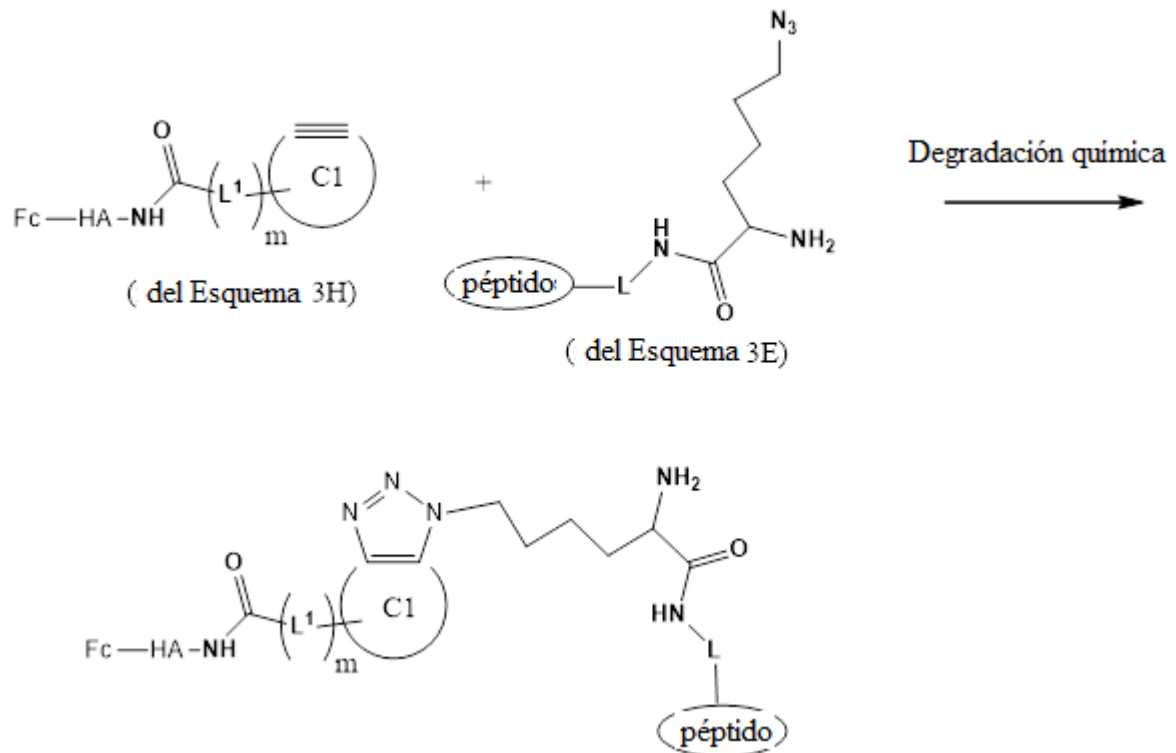


Esquema 6

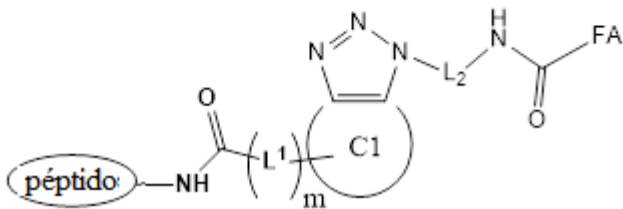
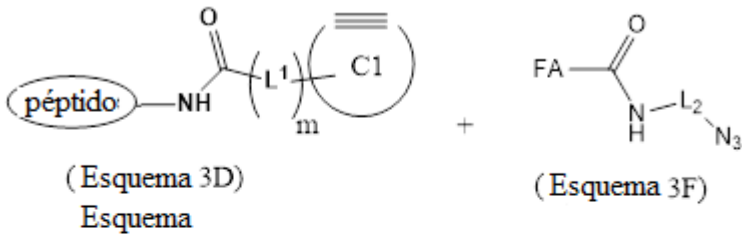
en donde AH es un enlazador introducido en el extremo N del péptido para facilitar la
 20 reacción en el extremo N- terminal, H es histidina, A es alanina, FA es un ácido graso como se describió anteriormente, por ejemplo, un ácido graso de la fórmula A1 a A3 , y L es una fracción enlazadora (por ejemplo, una fracción enlazadora PEG). El constructo 6a de ácido graso- enlazador (preparado como se muestra en el Esquema 3G) se introduce selectivamente
 25 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 (número de expediente PAT056275- US- PSP y PAT05418- US- PSP02).

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

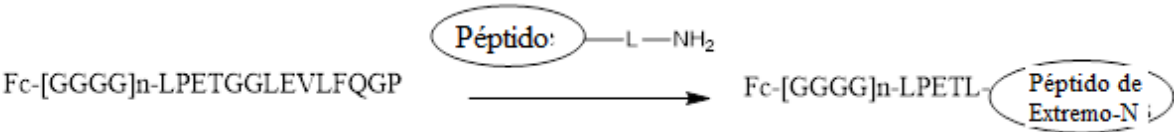


Esquema 7



Esquema 8

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



(SEQ ID NOs 20 y 21 respectivamente)

Esquema 9

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

10

De interés particular son las siguientes realizaciones de la invención:

15

En la realización 21, la invención se refiere al bioconjugado o un mutimero del mismo, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, 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 22, 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 fragmento Fc modificado de FcLALA con una mutación LALA (L234A, L235A).

- 5 En la realización 23, la invención se refiere al bioconjugado según cualquiera de las realizaciones 1,4,- 7, 13- 17, 21 y 22 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que está fusionado a un polipéptido según cualquiera de las Fórmulas I y III a IX 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: 16) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido
 10 según cualquiera de las fórmulas I y III o IX contiene aminoácidos de origen natural.

En la realización 23A, la invención se refiere a un bioconjugado de acuerdo con la realización 23 en donde la fracción de extensión de vida media es una variante Fc en donde la lisina del extremo C ha sido eliminada o sustituida por alanina.

15

En la realización 24, la invención se refiere al bioconjugado según la realización 23 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I en donde:

- 20 X1 es el extremo N del polipéptido y está ya sea ausente o se selecciona a partir de R, Q, A y K;
 X2 es R, A, K, H, F o E;
 X3 es P, A, K o D;
 X4 es R, A, F o E;
 X5 es L, A, K, D o F;
 25 X6 y X12 son C y están unidos juntos a través de un enlace de disulfuro (- S- S-);
 X7 es H, A, K, F, P, N o E
 X8 es K, F, A o E;
 X9 es G, A, D, L o R;
 X10 es P o A;
 30 X11 es M, A, F, Y, L o K; y
 X13 es el extremo C y está ausente o es seleccionado a partir de F, I, A, K, H y E.

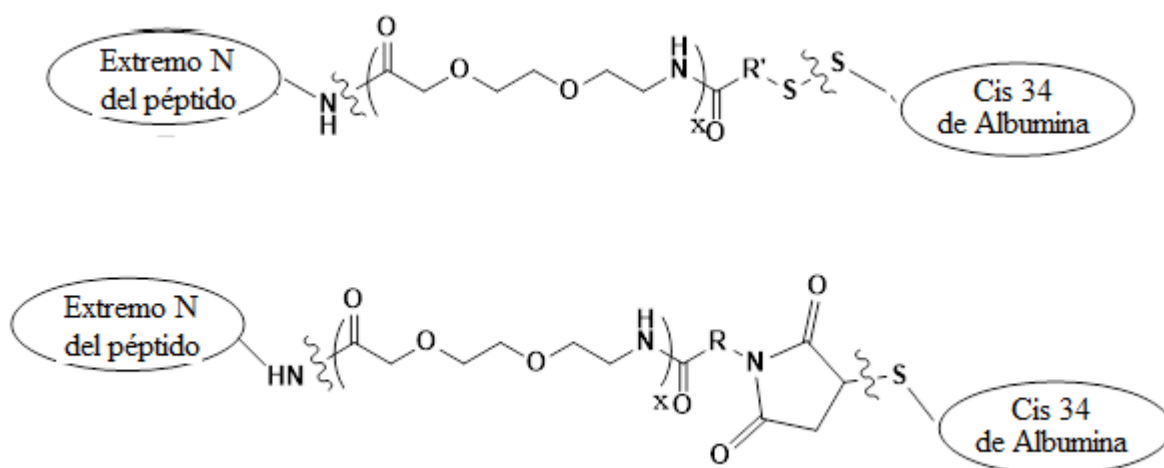
En la realización 25, la invención se refiere al bioconjugado según la realización 22, 23, o 24 en donde el polipéptido es:

Q- R- P- R- L- C*- H- K- G- P- M- C*- F (SEQ ID NO: 17).

5

En la realización 26, la invención se refiere al bioconjugado o multímero del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores en donde la fracción de extensión de vida media es albúmina de suero humano.

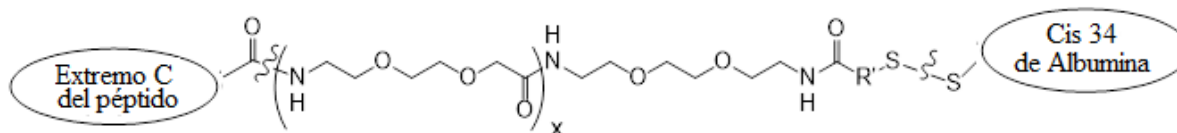
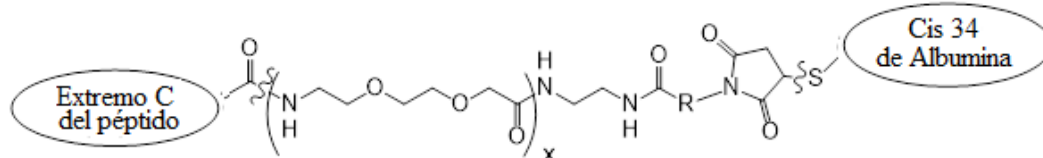
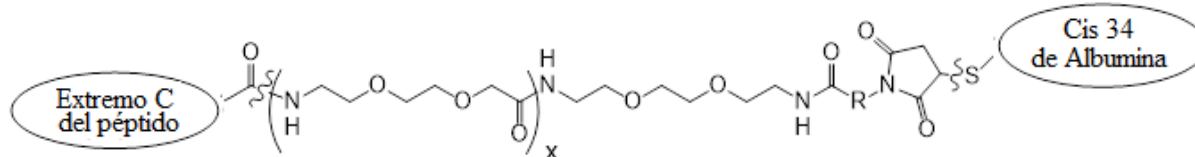
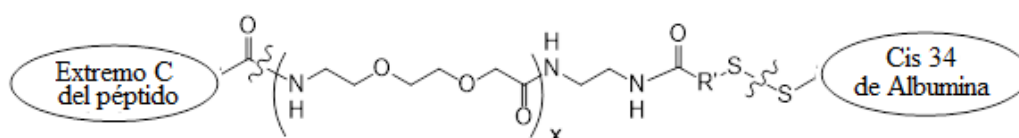
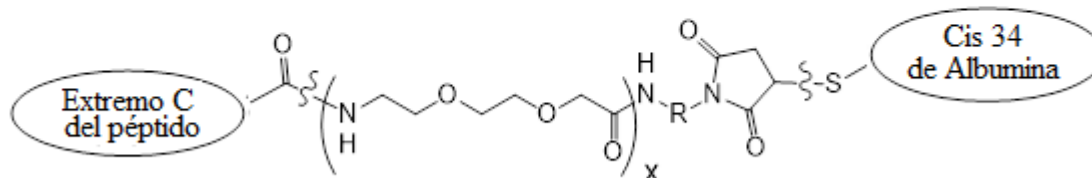
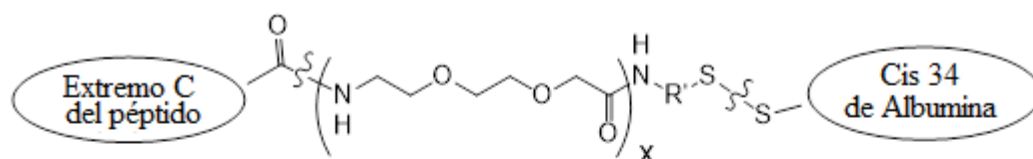
- 10 En la realización 27, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 25 o 26, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo N de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a VII y IX a través de las siguientes Fórmulas:



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

- En la realización 28, la invención se refiere al bioconjugado de acuerdo con la realización 26 o 27, en donde la albúmina de suero humano está químicamente ligada al extremo C de un polipéptido de cualquiera de las Fórmulas I a VII a través de un enlazador de las siguientes Fórmulas:
- 20

- 64 -

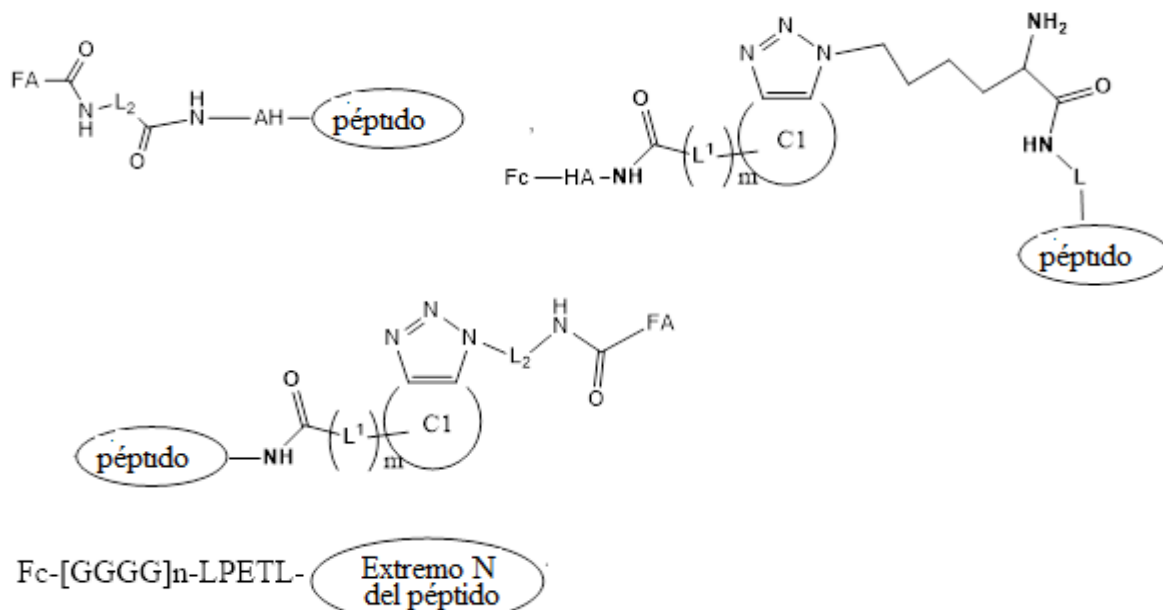


en donde x es 1 - 20, R es alquileo lineal o ramificado, cicloalquilo, arilo o heteroarilo o una combinación de los mismos, R' es alquileo lineal o ramificado, arilo o cicloalquilo o

5 combinación de los mismos.

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

- 65 -



en donde el péptido es el extremo N del péptido, A es alanina, H es histidina, m es 0 o 1, n es 0, 1, 2, o 3, L y L2 son enlazadores, C1 es un sistema de anillo mono, di o tricíclico

- 5 carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido por flúor y L¹ es un enlazador de alquileo C1- C20 en donde la cadena de alquileo 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.

10 Composiciones farmacéuticas

El bioconjugado de la presente invención puede ser administrado en cualquiera de una variedad de maneras, que incluyen por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por inhalación, por vía intranasal, por vía oral etc.

- 15 Realizaciones particulares preferidas de la invención emplean la administración intravenosa continua de los bioconjugados de la presente invención, o una amida, éster, o sal de los mismos. Los 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
- 20 continua de 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 de bioconjugados se proporciona durante al menos 3 días aproximadamente. En otras realizaciones, la administración

intermitente o continua del bioconjugado se proporciona durante al menos una semana aproximadamente. En otras realizaciones, la administración intermitente o continua del bioconjugado se proporciona durante al menos dos semanas aproximadamente. Puede ser deseable mantener una concentración plasmática promedio del bioconjugado por encima del valor del umbral determinado, ya sea durante la administración o entre la administración de dosis múltiples. Una concentración puede ser determinada, por ejemplo, con base en la condición fisiológica del sujeto, gravedad de la enfermedad, etc. Tales valores deseables pueden ser identificados al realizar pruebas estándar clínicas. 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 bioconjugado de la presente invención o una amida, un éster o una sal del mismo, 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, liofilizantes, 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 fabricación aséptica, esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes formadores de torta, agentes de tonicidad, 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 la inyectabilidad fácil exista. 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
5 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 partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La
10 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, amino ácidos, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las
15 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 esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes
20 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.

25 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 esterilización por filtración.

Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo
30 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

- 5 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

- 10 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 fluido 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

- 15 los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante

tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o estearatos; un deslizante como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante

- 20 tal como sacarosa

o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Formulaciones para la administración oral pueden ventajosamente incorporar agentes para mejorar la estabilidad

dentro del tracto gastrointestinal y/ o para mejorar la absorción.

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

- 30 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

5 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
10 transdérmicos.

Composiciones apropiadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un biocojugado 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
15 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.

20 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
25 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
30 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 bioconjugados de esta invención y, que normalmente no son biológicamente o de otro modo indeseables. En muchos casos, los bioconjugados 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, canforsulfonato, cloruro/hidrocloreuro, 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 hidrobromico, 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 Pharmaceutical Sciences*”, 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en “*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*” de Stahl y Wermuth (Wiley- VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Como se utiliza en 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 péptidos 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 (Pyr¹- apelina- 13). Cualquiera de estos péptidos de apelina, al unirse al receptor APJ, transduce la señal vía las proteínas Gi y Gq. En cardiomiocitos, el acoplamiento Gi o Gq conduce a cambios en el pH intracelular, activación PLC, y la producción de IP3 que mejoran la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y en última instancia resultan en un aumento de la contractilidad cardíaca. 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 cardíaca crónica estable tienen episodios agudos ocasionales de descompensación, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más y los síntomas empeoran. Estas exacerbaciones se conocen como la insuficiencia cardíaca 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 bioconjugado Apelina de la presente invención proporcionan una terapia para la falla cardíaca aguda 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 de Apelina (5 min) en seres humanos resulta en la vasodilatación coronaria y mejora el gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas nativas exhiben un t_{1/2} muy corto (segundos) y la duración de la acción (pocos minutos) in vivo. Potentes Agonistas APJ del bioconjugado sintético de la presente invención tienen una vida media más larga en comparación con la apelina nativa.

La activación del receptor APJ en cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardíaca 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 bioconjugados de la presente invención 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 ruta pAKT ha sido implicada en estos procesos.

Los bioconjugados comprenden polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las fórmulas I a IX, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor de APJ, por ejemplo, como se indica en pruebas in vitro e in vivo como se dispone en las siguientes secciones y por lo tanto se indican para tratamiento.

Los bioconjugados de la invención o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada a partir de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, 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.

Por lo tanto, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un bioconjugados como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una enfermedad que está asociada 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 a

partir de la lista anteriormente mencionada, adecuadamente insuficiencia cardiaca aguda descompensada. En aún otro subconjunto de esta realización, la presente invención proporciona el uso de bioconjugados como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una enfermedad que está asociada con la actividad del receptor APJ.

Así, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un bioconjugado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en 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 bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31, o un múltiplo del mismo. En una realización adicional, la enfermedad se selecciona a partir de la lista anteriormente mencionada, adecuadamente insuficiencia cardiaca aguda descompensada.

En aún otro subconjunto de esta realización, la invención proporciona un método de tratamiento que está asociado con la actividad del receptor de APJ, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31, o un múltiplo del mismo.

La cantidad efectiva de una composición farmacéutica o combinación de la invención a ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y objetivos. Un experto en el estado de la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento por lo tanto pueden variar dependiendo, en parte, de la molécula liberada, la indicación para la cual el bioconjugado es utilizado, la vía de administración, y el tamaño (peso corporal, la superficie del cuerpo, o el tamaño del órgano) y la condición (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 aproximadamente 100 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 bioconjugado de la presente invención se refiere a una cantidad del bioconjugado de la presente invención que producirá la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, mejorar un síntoma, aliviar condiciones, retardar la progresión de la enfermedad, o prevenir 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 bioconjugado 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 activa 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 cardíaca, 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.*,

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 bioconjugado según la presente invención puede evaluarse mediante los siguientes métodos *in vitro* & *in vivo* descritos más adelante.

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 bioconjugados 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 bioconjugados a las células con colorante (1:5, para concentraciones de bioconjugados 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 bioconjugados. Se calcularon los valores máximos y mínimos y se representaron gráficamente para cada concentración de bioconjugado, y el software GraphPad prism se utilizó para calcular los valores EC₅₀ en los puntos de inflexión de la curva, para la estimación de flujo de calcio por bioconjugados.

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

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

- 5 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).

- 10 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 homogeneizado se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 min a 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).
- 15

Procedimiento de Preparación de Muestras: (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.

- 20 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 µl 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
- 25 homogeneizado de pulmón diluido. Las muestras se incubaron a 37 ° 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, alícuotas de 25 uL de muestras de incubación se transfirieron a placas de 96 pozos e inmediatamente se precipitaron con proteína usando 150 uL de solución de extracción. Después de la terminación del experimento de incubación, la placa de
- 30 la muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 ° 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):

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

- 20 Fase móvil 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(%)
25	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
30	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:

- 5 Ensayo de estabilidad: Estabilidad de la vida media, ($t_{1/2}$), 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 = $100 \times (\text{área del pico de la muestra}) \div (t = 0 \text{ área del pico})$

- 10 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, $t_{1/2} = 0,693 \div k$

TABLA 2 Actividad y Estabiliad de Bioconjugados

Bioconjugado	hAPJ Ca²⁺ Flux EC₅₀ [nM]	Estabilidad del plasma basado en la actividad sustituta: $t_{1/2}$ [min]
Ejemplo 1	47.2	>1000
Ejemplo 2	92.4	>1000
Ejemplo 3	52.0	24.3
Ejemplo 4	9.2	212
Ejemplo 5	8.4	334
Ejemplo 6	8.9	>1000
Ejemplo 7	8.0	>1000
Ejemplo 8	>1000	-
Ejemplo 9	7.9	>1000
Ejemplo 10	7.6	>1000
Ejemplo 11	21.9	>1000
Ejemplo 12	26.2	>1000

Ejemplo 13	36.2	>1000
Ejemplo 14	3.8	>1000
Ejemplo 15	13.6	>1000
Ejemplo 16	15.8	>1000
Ejemplo 17	9.7	>1000
Ejemplo 18	32.0	>1000
Ejemplo 19	11.8	>1000
Ejemplo 20	65	>1000
Ejemplo Comparativo: Pyr- 1- Apelina - 13	6.6	5.0

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

Bioconjugado	Estabilidad plasmática $t_{1/2}$ [min]	Estabilidad plasmática basada en actividad suplenente $t_{1/2}$ [min]
Ejemplo 2	~1440	>1000
Pyr- 1- Apelina 13	6.6	5.0

5

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

El polipéptido de la presente invención puede tener estabilidad plasmática superior a apelina- 13 o pyr- 1- apelina- 13. En una realización, la mejoría en estabilidad plasmática es al menos de dos veces. En una realización, el bioconjugado de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 30 minutos. En otra realización, el bioconjugado de la invención tiene una estabilidad plasmática de al menos 10 minutos, al menos 40 min y más preferiblemente al menos 60 minutos.

El bioconjugado de la presente invención pueden administrarse bien sea simultáneamente con, o antes de o después de, uno o más agentes terapéuticos. El bioconjugado de la presente invención puede 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, la invención proporciona un producto que comprende un bioconjugado de cualquiera de las realizaciones 1 a 31, 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.

Productos proporcionadas como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un bioconjugado de cualquiera de las realizaciones 1 a 31, y los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o un bioconjugado de cualquiera de las realizaciones 1 a 31, y otros agentes terapéuticos en forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende un bioconjugado de cualquiera de las realizaciones 1 a 31 y otros agentes terapéuticos. 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 los cuales contiene un bioconjugado según cualquiera de las realizaciones 1 a 31. En una forma de realización, el kit comprende medios para retener por separado dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida o paquete de aluminio dividido. 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 bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico pueden fabricarse y/o formularse por los mismos o diferentes fabricantes. Además, el bioconjugado de la invención y el otro 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 bioconjugado 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 administración secuencial de un bioconjugado de la invención y el otro agente terapéutico.

Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31, para el tratamiento de una enfermedad o afección 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 el tratamiento de una enfermedad o afección sensible al agonismo del receptor apelina, en el que el medicamento se administra con un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31.

La invención proporciona también un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección sensible al agonismo del receptor APJ, en el que el bioconjugado se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección sensible al agonismo del receptor APJ, en el que el otro agente terapéutico se prepara para la administración con un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31.

La invención también proporciona el uso de un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 31, para el tratamiento de una enfermedad o afección sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o

afección sensible al agonismo del receptor APJ, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de las 24 horas) con un bioconjugado según cualquiera de las realizaciones 1 a 31.

En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de inotropos, 5 bloqueadores de receptores beta- adrenérgicos, inhibidores de la HMG- CO- A reductasa, antagonistas del receptor de la angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora 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 10 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 bioconjugado de la invención (*ej.*, un bioconjugado según cualquiera de las realizaciones 1 a 31 o un compuesto de otra manera descrito en la presente) con el segundo 15 agente o tratamiento, 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 bioconjugado 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, 20 *ej.* .un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, tal como por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda descompensada(ADHF), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertension, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes 25 gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, 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 30 angiotensina II, inhibidores de la enzima convertidora 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,
5 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.

10 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- hidroxil- beta- metilglutaril- co- enzima- A reductasa) incluye agentes activos que pueden utilizarse para reducir los niveles de lípidos incluyendo el colesterol en la sangre.

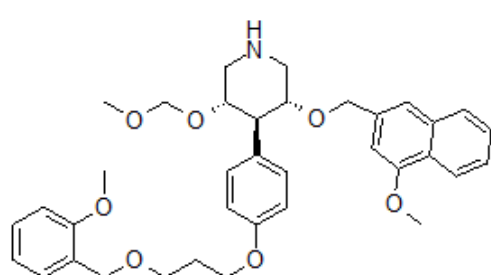
15 Ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina, rivastatina, simvastatina, y velostatina, o, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “inhibidor de la ACE” (también llamado inhibidores de la enzima convertidora 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 sanguínea y para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. Ejemplos incluyen alacepril, benazepril, benazeprilat, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, spirapril, temocapril, y trandolapril, o sales farmacéuticamente aceptables
25 de los mismos.

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

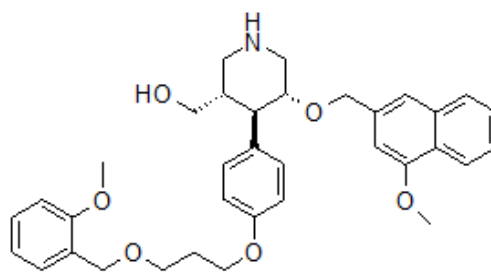
El término “inhibidor de la renina” incluye ditekiren (nombre químico: [1S- [1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]- 1- [(1,1- dimetiletoxi)carbonil]- L- prolil- L- fenilalanil- N- [2-
30 hidroxil- 5- metil- 1- (2- metilpropil)- 4- [[[2- metil- 1- [(2- piridinilmetil)amino]carbonil]butil]amino]carbonil]hexil]- N- alfa- metil- L- histidinamida); terlaquiren (nombre químico: [R- (R*,S*)]- N- (4- morfolinilcarbonil)- L- fenilalanil- N- [1-

(ciclohexilmetil)- 2- hidroxil- 3- (1- metiletoxi)- 3- oxopropil]- S- metil- L- cisteineamida); Alisquiren (nombre químico: (2S,4S,5S,7S)- 5- amino- N- (2- carbamoil- 2,2- dimetiletil)- 4- hidroxil- 7- {[4- metoxil- 3- (3- metoxipropoxil) fenil]metil}- 8- metil- 2- (propan- 2- il)nonanamida) and zanquiren (nombre químico: [1S-
 5 [1R*[R*(R*)],2S*,3R*]- N- [1- (ciclohexilmetil)- 2,3- dihidroxil- 5- m etilhexil]- alfa- [[2- [[(4- metil- 1- piperazinil)sulfonil]metil]- 1- oxo- 3- fenilpropil]- amino]- 4- tiazolpropanamida), o, sales de hidrocloreuro de los mismos, o, SPP630, SPP635 y SPP800 como se desarrolló Speedel, o RO 66- 1132 y RO 66- 1168 de la Fórmula (A) y (B):



(A)

y



(B)

o sales

10 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)
 15 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
 20 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 de tiazida (ej., clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida, y clorotalidon).

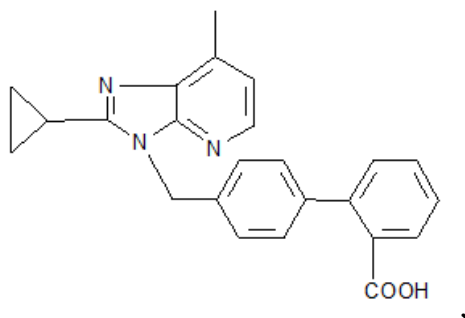
El término “Mimético ApoA- I” incluye péptidos D4F (ej., fórmula D- W- F- K- A- F-
 25 Y- D- K- V- A- E- K- F- K- E- A- F (SEQ ID NO: 22))

Un antagonista del receptor de angiotensina 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 AT₁, estos antagonistas pueden, por ejemplo ser

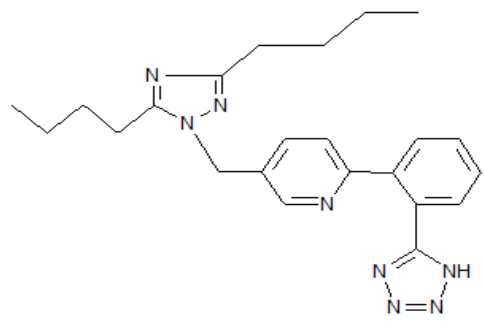
5 empleados como antihipertensivos o para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva.

La clase de antagonistas de receptores AT₁ 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,

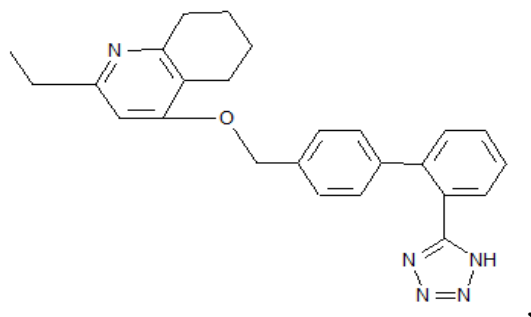
10 telmisartan, el compuesto con la designación E- 1477 de la siguiente fórmula



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



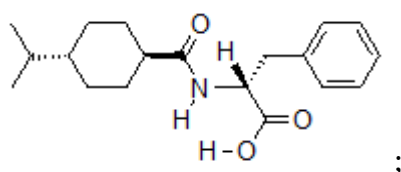
y el compuesto con la designación ZD- 8731 de la siguiente fórmula



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

Antagonistas de receptores AT₁ preferidos 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.

- 5 El término “agente anti- diabético” incluye potenciadores de la secreción de insulina que promueven la secreción de insulina a partir de células b 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, 10 glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepid, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida, y tolilciclamida), o sales farmacéuticamente aceptables 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



- 15 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 (2S)- 2- bencil- 3- (*cis*- hexahidro- 2- isoindolilcarbonil)- de calcio (*ej.*, mitiglinida (cf. EP 507534)); y glipepirida (cf. EP 31058).

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

- 25 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 pancreática 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.

5 GLP- 1 (péptido 1 tipo glucagón) es una proteína insulínica 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)NH₂ los cuales se divulgan en particular en US 5,120,712, US 5,118,666, US 5,512,549, WO 91/11457 y por C. Orskov en *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12826. Ejemplos adicionales
10 incluyen GLP- 1(7- 37), en los cuales el compuesto, la funcionalidad de amida carboxi-terminal de Arg³⁶ se desplaza con Gly en la posición 37 de la molécula GLP- 1(7- 36)NH₂ y variantes y análogos de las mismas incluyendo GLN⁹- GLP- 1(7- 37), D- GLN⁹- GLP- 1(7- 37), acetil LYS⁹- GLP- 1(7- 37), LYS¹⁸- GLP- 1(7- 37) y, en particular, GLP- 1(7- 37)OH, VAL⁸- GLP- 1(7- 37), GLY⁸- GLP- 1(7- 37), THR⁸- GLP- 1(7- 37), MET⁸- GLP- 1(7- 37) y
15 4- imidazopropionil- GLP- 1. Se otorga preferencia especial al análogo del agonista de GLP extendina- 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
20 insulina. Ejemplos incluyen derivados de la tiazolidinodiona hipoglucémica (*ej.*, glitazona, (S)- ((3,4- dihidro- 2- (fenil- metil)- 2H- 1- benzopiran- 6- il)metil- tiazolidina- 2,4- diona (englitazona), 5- {[4- (3- (5- metil- 2- fenil- 4- oxazolil)- 1- 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-
25 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-
30 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}- thazolidina- 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-
 hidroxil- 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
 5 (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 proteína tirosina fosfatasa (PTPases), compuestos
 10 miméticos antidiabéticos de moléculas no pequeñas e inhibidores de la glutamina- fructosa- 6-
 fosfato amidotransferasa (GFAT); compuestos que influyen en la producción 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
 15 (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 α tipo no-
 glitazona; agonistas duales PPAR α / PPAR γ ; compuestos que contienen vanadio antidiabético;
 hormonas de incretina, péptido 1 tipo glucagón (GLP- 1) y agonistas de GLP- 1; antagonistas
 20 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
 bioconjugado según cualquiera de las realizaciones 1 a 31, y uno o más agentes
 25 terapéuticamente activos seleccionados a partir de bloqueadores de receptores α_1 -
 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 DPP- IV (ej. vildagliptina) y
 agonista del péptido GLP1.

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

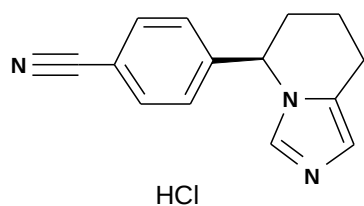
Un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se entiende que es un ingrediente activo que tiene la propiedad de inhibir la producción de aldosterona. **La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una enzima mitocondrial del citocromo P450 que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza**

5 **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 fácilmente por los expertos en la técnica
10 según ensayos estándar (*ej.*, EE.UU. 2007/0049616).

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

Se otorga preferencia a inhibidores de la aldosterona sintasa comercialmente
15 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 esteroideo de la aldosterona sintasa es el enantiomero (+) del hidrocloreto de fadrozol (patentes EE.UU.
20 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
25 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- carboxílico; **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 enantiómero (R) o (S) de los mismos; o si apropiadamente, una sal farmacéuticamente 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- *c*][1,4]oxazina; 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- methoxibenzonitrilo; 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- 1*H*- 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- sulfónico, *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}- 1*H*- indol- 3- carbonitrilo, 6- cloro- 2- [5- (4- metanosulfonil- piperazin- 1- ilmetil)- piridin- 3- il]- 1- metil- 1*H*- indol- 3- carbonitrilo, 6- Cloro- 1- metil- 2- {5- [(1- metil- piperidin- 4- ilamino)- metil]- piridin- 3- il}- 1*H*- indol- 3- carbonitrilo, [5- (6- cloro- 3- ciano- 1- metil- 1*H*- indol- 2- il)- piridin- 3- ilmetil]- amida del ácido Morfolina- 4- carboxílico, *N*- [5- (6- Cloro- 1- metil- 1*H*- 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- 1*H*- pirrolo[2,3- b]piridin- 2- il)- piridin- 3-

ilmetil]- amida del ácido etanosulfónico y {[5- (3- cloro- 4- ciano- fenil)- piridin- 3- il]- ciclopropil- metil}- etil- amida del ácido etanosulfónico.

El término “bloqueador del receptor de entotelina” incluye bosentan y ambrisentan.

- 5 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 fácilmente 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)- metoxycarbonil- amino]- 2- etil- 6- trifluorometil- 3,4- dihidro- 2H- quinolina- 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
- 10 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
- 15 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-
- 25 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.
- 30 Los inhibidores de NEP también incluyen agentes anti- hipertensivos de acción dual como se divulga en las solicitudes 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.

5 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 eficaz del bioconjugado según cualquiera de las realizaciones anteriores, o un múltimero del mismo.

10 En una realización, la invención proporciona un método de tratamiento de 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 eficaz de un bioconjugado según cualquiera de las realizaciones precedentes, o un múltimero del mismo.

15 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, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial

20 periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos temporales, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemaduras solares) y preeclampsia.

25 En una realización, la invención proporciona un bioconjugado según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o un múltimero de los mismos, para su uso como un medicamento.

En una realización, la invención proporciona el uso de un bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, o un múltimero de los mismos, 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

30 bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, o un múltimero del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de un trastorno o enfermedad sensible a la activación del receptor APJ, en el que dicho trastorno o enfermedad

se selecciona en particular a partir de insuficiencia cardiaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación auricular, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, laterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades cardiovasculares isquémicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, arritmia, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones por quemaduras (incluyendo quemadura de sol) y preeclampsia.

10 Ejemplificación de la invención: síntesis de péptidos y polipéptidos para la conjugación con una fracción de extensión de vida media.

Abreviatura	Definición
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
Acm	Acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	ácido acético
Ac ₂ O	anhídrido acético
AM	Aminometil
BAL	Enlazador de amida de esqueleto
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Boc	<i>tert</i> - Butiloxicarbonil
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'- diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N, N'- diisopropiletilamina
DMA	N,N'- Dimetilacetamida
DTT	ditiotreitol
DMF	N,N'- dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVB	Divinilbenceno
EDT	Etanoditiol

FA	Ácido Fórmico
Fmoc	9- fluorenilmetiloxycarbonilo
HATU	<i>Hexafluorofosfato de 2- (1H- 9- azabenzotriazol- 1- il)- 1,1,3,3- tetrametiluronio</i>
HBSS	<i>Solución salina amortiguada de Hank</i>
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- hidroxí- 7- azabenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
HSA	Albúmina de Suero Humano
ivDde	(4,4- dimetil- 2,6- dioxociclohex- 1- ilideno)- 3- metilbutilo
LN	Logarithmus naturali (logaritmo natural)
MPA	Ácido 3- (maleimino) propiónico
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
pE	Piroglutamato
PG	Grupo protector
PBS	Solución salina amortiguada por fosfato
Ph	Fenilo
PS	Poliestireno
POL	Soporte polimérico
rt	temperatura ambiente
SPPS	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños

tBuOH	<i>tert</i> - butanol
TCEP	tris(2- carboxietil)fosfina
TIPS/TIS	triisopropilsilano
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
TPA	Ácido 3- mercaptopropanoico
t _R	tiempo de retención
Trt	Tritilo
UPLC:	Cromatografía líquida de ultra desempeño
UV	Ultravioleta

Los péptidos a continuación se sintetizaron mediante química Fmoc estándar de fase sólida. Los péptidos se sintetizaron en el sintetizador de péptidos Prelude™ (Protein Technologies, Inc., Tucson, USA). Los péptidos con un ácido carboxílico libre en el extremo C se sintetizaron a partir de cloruro de 2 clorotritilo – resina PS- (ABCR, Karsruhe, Alemania). Los péptidos con una carboxamida no sustituida en el extremo C se sintetizaron a partir de resina Rink- amida- AM- PS protegida con Fmoc (Merck, Darmstadt, Alemania). Los péptidos con una carboxamida N- monosustituida en el extremo C se sintetizaron a partir de resina BAL- AM- PS- 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 SunFire Prep C18 OBD, 5 µm, 30x150 mm, Parte No. 186002572
- Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 µm, 30x150 mm, Part No. 186002797
- Columna Waters Atlantis Prep OBD T3, 5 µm, 30x150 mm, Parte No.186003703
- Columna Waters XBridge Prep C8 OBD, 5 µm, 30x150 mm, Parte No. 186003083
- Machery- Nagel Nucleosil® 100- 5 C18, 5 µm, 250x40 mm, Parte No. 715340.400

Las fases móviles constaron de eluyente A (0.1% TFA en H₂O) 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/H₂O.

- 5 Los productos se analizaron por HPLC usando detección UV a $\lambda = 214$ nm y UPLC-MS usando ionización por electrospray.

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 pequeñas, respectivamente.

TABLA 4

Péptido	Secuencia	Tipo de Anillo	SEQ ID NO:
Péptido 1	<i>p</i> E- R- P- R- L- K- H- F- G- P- Nle- D- Fenetilamina	Lactama K ⁶ - D ¹²	23
Péptido 2	<i>p</i> E- R- P- R- L- K- H- F- G- P- Nle- D- Fenetilamina	Lactama K ⁶ - E ¹²	24
Péptido 3	<i>p</i> E- R- P- R- L- Orn- H- F- G- P- Nle- D- Fenetilamina	Lactama O ⁶ - D ¹²	25
Péptido 4	<i>p</i> E- R- P- R- L- Dab- H- F- G- P- Nle- D- Fenetilamina	Lactama Dab ⁶ - D ¹²	26
Péptido 5	<i>p</i> E- R- P- R- L- K- F- K- G- P- Nle- F	Lactama K ⁶ - extremo C	27
Péptido 6	<i>p</i> E- R- P- R- L- K- F- K- G- P- Nle- f	Lactama K ⁶ - extremo C	28
Péptido 7	Q- R- P- R- L- C- F- K- G- P- Nle- C- F- G- G	Lactama extremo N- extremo C- Disulfuro C ⁶ - C ¹²	29
Péptido 8	<i>p</i> E- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- <i>OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	30
Péptido 9	<i>p</i> E- R- P- R- L- C- Aib- K- G- P- Nle- C- F- <i>OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	31
Péptido 10	<i>p</i> E- R- P- R- L- C- Aib- K- G- P- Nle- C- f- <i>OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	32
Péptido 11	<i>H</i> - Isn- R- P- R- L- C- Aib- K- G- P- Nle- C- f- <i>OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	33
Péptido 12	<i>p</i> E- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- Fenetilamina	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	34
Péptido 13	<i>p</i> E- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- f- <i>OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	35

Péptido 14	<i>pE- R- P- R- Cha- C- H- K- G- P- Cha- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	36
Péptido 15	<i>pE- R- P- R- L- C- F- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	37
Péptido 16	<i>H- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁵ - C ¹¹	38
Péptido 17	<i>H- R- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	39
Péptido 18	<i>H- Isn- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	40
Péptido 19	<i>pE- R- P- R- L- C- H- F- G- P- Nle- C- Fenetilamina</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	41
Péptido 20	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- Aib- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	42
Péptido 21	<i>pE- R- P- R- L- C- H- (4- NH- Isn)- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	43
Péptido 22	<i>pE- R- P- C- L- C- C- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuros C ⁶ - C ¹² C ⁴ - C ⁷	44
Péptido 23	<i>pE- R- C- R- L- C- C- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuros C ⁶ - C ¹² C ³ - C ⁷	45
Péptido 24	<i>pE- r- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	46
Péptido 25	<i>pE- F- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	47
Péptido 26	<i>pE- E- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	48
Péptido 27	<i>pE- R- p- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	49
Péptido 28	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	50
Péptido 29	<i>pE- R- D- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	51
Péptido 30	<i>pE- R- P- F- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	52
Péptido 31	<i>pE- R- P- R- K- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	53
Péptido 32	<i>pE- R- P- R- L- C- H- E- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	54
Péptido 33	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- D- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	55
Péptido 34	<i>pE- R- P- E- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	56
Péptido 35	<i>pE- R- P- R- (4- PhF)- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	57
Péptido 36	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	58
Péptido 37	<i>pE- R- P- R- L- C- E- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	59
Péptido 38	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- L- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	60
Péptido 39	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- R- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	61
Péptido 40	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- (ácido pipecólico)- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	62
Péptido 41	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- (3- PyA)- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	63
Péptido 42	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- H- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	64

Péptido 43	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- E- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	65
Péptido 44	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	66
Péptido 45	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- hC- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	67
Péptido 46	<i>pE- R- P- R- L- hC- H- K- G- P- Nle- hC- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	68
Péptido 47	<i>pE- R- P- R- L- c- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	69
Péptido 48	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- (D- hC)- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	70
Péptido 49	<i>pE- R- P- R- L- (D- hC)- H- K- G- P- Nle- (D- hC)- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	71
Péptido 50	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- c- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	72
Péptido 51	<i>pE- R- P- R- L- c- H- K- G- P- Nle- c- F- OH</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	73
Péptido 52	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- NH₂</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	74
Péptido 53	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- NH₂</i>	Disulfuro C ⁶ - C ¹²	75
Péptido 54	<i>pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH</i>	Monosulfuro C ⁶ - C ¹²	76

Métodos Analíticos

1a) HPLC – Método Analítico A

- Columna: Bischoff UHC- 640 (53x4.0 mm) con ProntoSil 120- 3- C18- H, 3 µm; Parte n°: 0604F185PS030
- Eluyente A: 0,07% TFA en agua; Eluyente B: 0.1% TFA 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) UPLC – Método Analítico B

- Columna: XBridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 µm; Parte n°: 186003612

- Eluyente A: 0,1% TFA en agua; Eluyente B: 0.1% TFA 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

5

2) UPLC- MS – Método Analítico C

- Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm, 2.1x50 mm; Parte n°: 186002350
- Eluyente A: 0,1% TFA en agua; Eluyente B: 0.1% TFA en ACN
- Flujo: 0,7 ml/min
- Temperatura: 40 °C
- Gradiente:

10

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

Los datos analíticos para péptidos 1 a 54 se resumen en la Tabla 5 y se generó utilizando los métodos analíticos descritos anteriormente.

15

3) Método Analítico D:

- Columna XBridge C18, 3.5 µm, 3.0 x 30 mm

- Eluyente: A: Agua (0,1% ácido fórmico); 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: Rango de medida del quadripolo único ESI 150- 1600
- 5
- HPLC: Serie Agilent 1100
 - Temperatura: 40° C

TABLA 5 Péptido para conjugación con una fracción de extensión de vida media

10

	HPLC		Espectrometría de masa				
Péptido	t _R [min]	Método.	[M+2H] ² + (medido)	[M+3H] ³ + (medido)	Método.	[M+2H] ² + (calc.)	[M+3H] ³ + (calc.)
1	4.16	A	766.3	511.2	C	766.4	511.3
2	4.18	A	773.5	515.8	C	773.4	516.0
3	4.14	A		506.6	C	759.4	506.6
4	4.15	A	752.4	501.9	C	752.4	501.9
5	3.70	A		484.5	C	726.4	484.6
6	3.84	A		484.5	C	726.4	484.6
7	3.85	A		553.6	C	829.9	553.6
8	3.43	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6
9	3.77	A		495.2	C	742.4	495.3
10	3.74	A	742.5	495.1	C	742.4	495.3
11	3.61	A	742.9	495.2	C	742.4	495.3
12	3.62	A		497.8	C	746.4	497.9
13	3.49	A	768.3	512.5	C	768.4	512.6
14	4.14	A	808.5	539.2	C	808.4	539.3
15	3.99	A	773.4	515.8	C	773.4	515.9
16	3.36	A		475.5	C	712.9	475.6
17	3.28	A		527.5	C	790.9	527.6

18	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
19	4.38	A	756.0	504.2	C	755.9	504.3
20	3.17	A	782.6	522.0	C	782.4	521.9
21	3.45	A		512.0	C	767.4	511.9
22	4.16	A	723.7		C	723.8	482.9
23	3.85	A	753.0	502.5	C	753.3	502.6
24	3.39	A		512.5	C	768.4	512.6
25	4.08	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
26	3.59	A	754.8	503.6	C	754.9	503.6
27	3.36	A		512.5	C	768.4	512.6
28	3.14	A		522.8	C	783.9	522.9
29	3.36	A		518.5	C	777.4	518.6
30	3.91	A	763.8	509.4	C	763.9	509.6
31	3.05	A		517.5	C	775.9	517.6
32	3.67	A	768.7	512.8	C	768.9	512.9
33	3.47	A		531.7	C	797.4	531.9
34	3.60	A	754.9	503.6	C	754.9	503.6
35	3.91	A		549.1	C	823.4	549.3
36	3.10	A	769.2	513.1	C	769.4	513.2
37	3.58	A	764.2	509.7	C	764.4	509.9
38	3.82	A		531.1	C	796.4	531.3
39	3.16	A		545.5	C	817.9	545.6
40	3.54	A		517.1	C	775.4	517.3
41	2.53	A		524.1	C	785.9	524.3
42	2.49	A		509.2	C	763.4	509.3
43	2.73	A	759.3	506.5	C	759.4	506.6
44	2.72	A	694.5		C	694.8	463.6
45	3.38	A		517.1	C	775.4	517.3
46	3.45	A		521.9	C	782.4	521.9
47	3.52	A	768.4	512.5	C	768.4	512.6
48	3.43	A	775.3	517.1	C	775.4	517.3

49	3.83	A	782.3	521.8	C	782.4	521.9
50	3.42	A	768.1	512.4	C	768.4	512.6
51	3.66	A	768.3	512.4	C	768.4	512.6
52	3.22	A		512.3	C	767.9	512.3
53	2.71	A	694.3	463.1	C	694.4	463.2

Procedimientos Sintéticos Generales

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

5 *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 19 h. La resina se drenó y luego se lavó a fondo secuencialmente con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1), 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:

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

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

2) Síntesis de péptidos de fase sólida sobre sintetizador *Prelude™*

2a) Ciclo de Síntesis A

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 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.

2b) Ciclo de Síntesis B

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina/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.

2c) Ciclo de Síntesis C

La resina se lavó con DMA. Fmoc se eliminó por tratamiento repetitivo con piperidina/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 (6 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.

2d) Ciclo de Síntesis D

- 5 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 de una mezcla del aminoácido Fmoc y Oxima Pure (3 eq. cada uno; 0,2 M de ambos en NMP), y DIC (3 eq.; solución a 0,3 M en NMP), seguido por la mezcla de la suspensión con nitrógeno a temperatura ambiente durante típicamente 15 min a 4 h,
- 10 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.

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

3a) Método de Escisión A

- La resina (0,1 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h con TFA/TIS/DTT 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,
- 20 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
- 25 éter frío (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en alto vacío.

3b) Método de Escisión B

- La resina (0,1 mmol) se trató con TFA / EDT (4:1) acuoso al 95% (0,75 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió una mezcla de TFA acuoso
- 30 al 95% (2,18 ml) y TIS (75 μL) y agitación a temperatura ambiente se continuó durante 1 h.

La solución de escisión se separó por filtración, luego se agregó a TFA / EDT / TIS al 95% (95:2,5:2,5) (3 ml) a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración y se recolectó 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. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron sobre heptano / dietil éter frío (1:1) (35 ml). El precipitado así formado se dejó sedimentar, se centrifugó, luego el sobrenadante se vertió cuidadosamente. El precipitado se lavó una vez con heptano / dietil éter frío (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se secó en alto vacío.

10 3c) Método de Escisión C

Se añadió HFIP / DCM (30:70) (5 ml) a la resina (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se recogió y se agregó (30:70) (5 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de escisión se separó por filtración y se recolectó. La resina se lavó con DCM (2 x 5 mL) que también se recogió. La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad en alto vacío. El residuo se liofilizó a partir de tBuOH/H₂O (1:1).

4) Métodos de Ciclización

4a) Método de Ciclización A (Formación de Disulfuro)

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

4b) Método de Ciclización B (Formación de Disulfuro)

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente) se disolvió en H₂O para proporcionar típicamente una concentración de 10 mg/ml. Se añade una solución de I₂ a 50 mM en AcOH (1.2 eq) en una porción a la solución agitada y la solución se agita durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H₂O (1.5 eq) para apagar el exceso de I₂. La solución se concentró hasta casi sequedad al vacío.

4c) Método de Ciclización C (*Formación Selectiva de Dos Disulfuros*)

El péptido precursor lineal parcialmente protegido (1 eq.) (dos cisteínas están protegidas con AcM y dos cisteínas no están protegidas) se disolvió en AcOH/H₂O (4:1) para proporcionar típicamente una concentración de 1 mg / ml. Se añadió I₂ a 50 mM en AcOH (2 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Además I₂ a 50 mM
 5 en AcOH (10 eq.) se añadió por porciones durante 4 h. Después de 21 h, la mezcla de reacción se concentró hasta casi sequedad al vacío y 1 M de ácido ascórbico en H₂O se añadió en exceso para apagar I₂ sin reaccionar.

4d) Método de Ciclización D (*Formación de Lactama Entre Cadenas Laterales*)

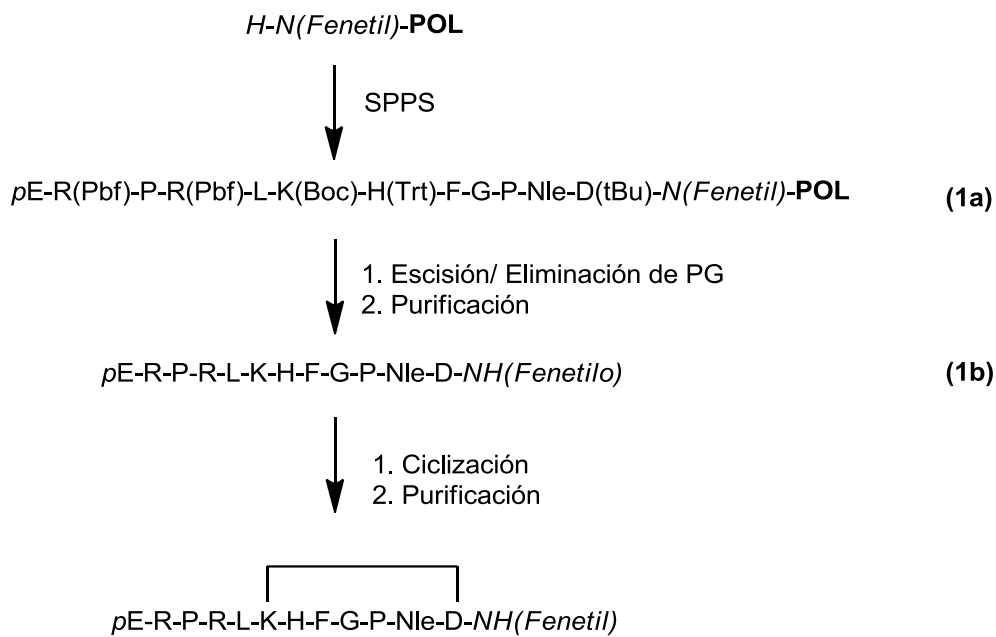
El péptido precursor lineal totalmente desprotegido (1 eq.) y HATU (1,5 eq.) se
 10 disolvieron en NMP (concentración peptídica: típicamente 1 mmol / L). Se añadió DIPEA (3 eq.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 90 min. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad al vacío.

4e) Método de Ciclización E (*Formación de Lactama Entre Cadena Lateral y Extremo C*)

Una solución del péptido (1 eq.), HATU (1.3 eq) y HOAt (1.3 eq.) en DMF
 15 (concentración peptídica: 2,6 mmol/l) se trató con 2,6- lutidina (20 eq.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad al vacío.

En el siguiente se describen las síntesis de ejemplos representativos.

Péptido 1 Síntesis de pE- R- P- R- L- K- H- F- G- P- Nle- D- Fenetilamina (K⁶- D¹²
 20 lactama) (SEQ ID NO: 23)



Péptido 1

(SEQ ID NOS 77, 23 y 23 respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermedio 1a**

(Ensamblaje de péptido lineal)

5 Resina de fenetilamina- BAL- PS (167 mg, 0,100 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	D(tBu)	2 x 4 h	C
2	Nle	1 x 3 h	C
3	P	2 x 45 min	C
4	G	2 x 90 min	C
5	F	1 x 3 h	C
6	H(Trt)	2 x 45 min	C
7	K(Boc)	2 x 4 h	C
8	L	4 x 1 h	C

9	R(Pbf)	4 x 1 h	C
10	P	2 x 90 min	C
11	R(Pbf)	4 x 1 h	C
12	pE	2 x 90 min	C

- Preparación de **Intermedio 1b**

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

- 5 Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (2 ml) a **Intermedio 1a** (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h. La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a
- 10 temperatura ambiente durante 45 min. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con TFA acuoso (1 ml) al 95%. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron 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) (20 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió.
- 15 El sólido se secó en alto vacío. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio 1b** como un sólido blanco en dos lotes de diferentes cualidades. Lote A (35,9 mg (98% de pureza), 0.018 mmol y lote B (52.9 mg (80% de pureza), 0.021 mmol).

20

- Preparación del **Péptido 1**

(Ciclización y purificación)

Ambos lotes procedentes del paso anterior se trataron por separado siguiendo el mismo protocolo:

- 25 Lote A: Una solución del péptido (35,9 mg (98% de pureza), 0,018 mmol) y HATU (10,0 mg, 0,026 mmol) en NMP (18 ml) y DIPEA (9,2 µl, 0,053 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

Lote B: Una solución del péptido (52,9 mg (80% de pureza), 0,021 mmol) y HATU (14,5 mg, 0,038 mmol) en NMP (13,0 ml) y DIPEA (13,0 μ l, 0,076 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

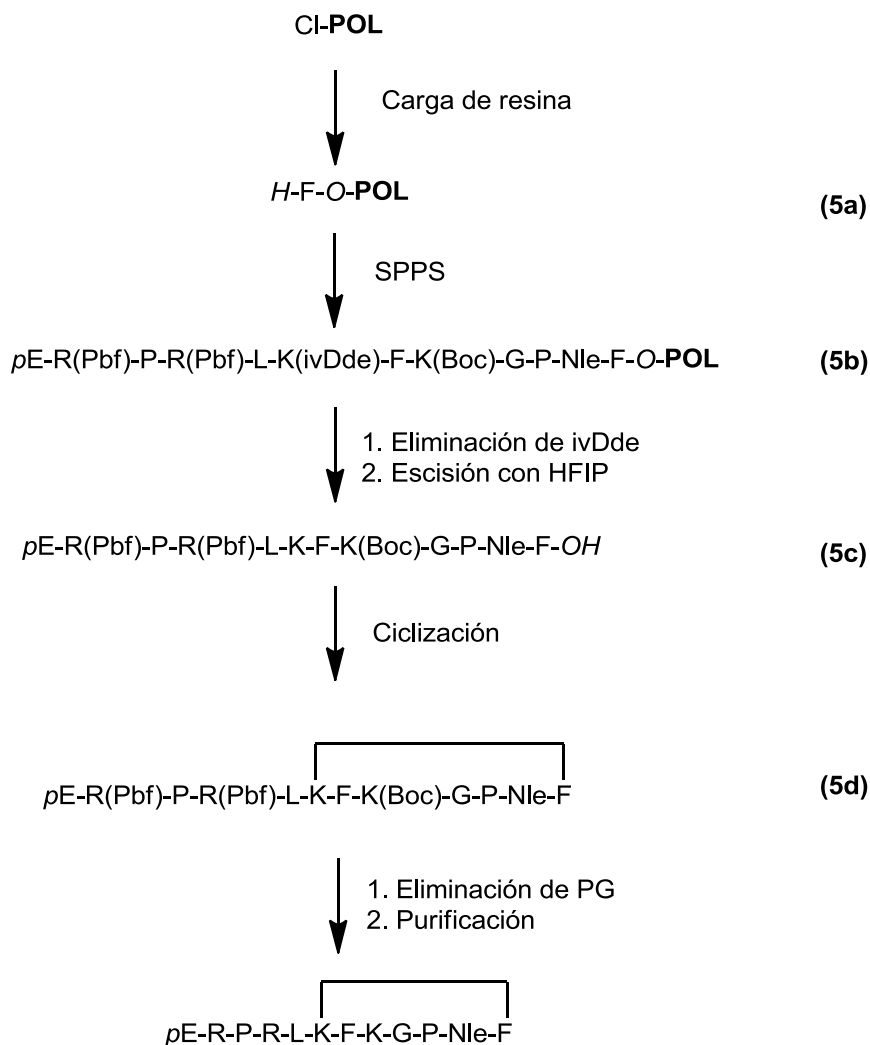
5 Cada uno de los lotes se concentró hasta sequedad al vacío El producto se aisló mediante HPLC preparativa Las fracciones puras de ambas purificaciones se combinaron y liofilizaron a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Péptido 1** como un sólido blanco (52,0 mg, 0,025 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 4,16 min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}=511.2$; calculado: $[M+3]^{3+}=511.3$).

10

Péptido 5 Síntesis de pE- R- P- R- L- K- F- K- G- P- Nle- F (lactama K⁶- extremo C) (SEQ ID NO: 27)

- 113 -



Péptido 5

(SEQ ID NOS 78, 79, 79 y 27, respectivamente en orden de aparición)

- Preparación de **Intermedio 5a**

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

5

Se hizo reaccionar resina de cloruro de 2- clorotritilo (10,0 g, 16,0 mmol) con una solución de Fmoc- F- OH (6,24 g, 3,20 mmoles) en DCM (100 mL) y DIPEA (11,2 mL, 64,0 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermedio 5a** (12,8 g, carga = 0,79 mmoles / g).

- Preparación de **Intermedio 5b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

El **Intermedio 5a** (0,100 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
2	Nle	2 x 90 min	B
3	P	2 x 30 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(ivDde)	2 x 30 min	B
6	F	2 x 30 min	B
7	K(Boc)	4 x 1 h	B
8	L	2 x 30 min	B
9	R(Pbf)	4 x 1 h	B
10	P	2 x 90 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	pE	2 x 90 min	B

5

- Preparación de **Intermedio 5c**

(Escisión de ivDde y escisión a partir de la resina)

Intermedio 5b (0,100 mmoles) se trató seis veces durante 10 min con una solución de monohidrato de hidrazina (0,081 ml, 1,67 mmol) en DMA (4 ml). Luego la resina se trató tres veces durante 20 min con una solución de monohidrato de hidrazina (0,081 ml, 1,67 mmol) en THF (4 ml). La resina se lavó con DCM (3x). Se añadió HFIP / DCM (30:70) (5 ml) a la resina (0,100 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se agregó HFIP/DCM fresco (30:70) (5 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de escisión se separó por filtración. La resina se lavó con DCM (2 x 5 mL). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. El residuo se liofilizó a partir de

15

tBuOH/H₂O (1:1) para proporcionar **Intermedio 5c** (187 mg, 0,090 mmol).

- Preparación del **Péptido 5**

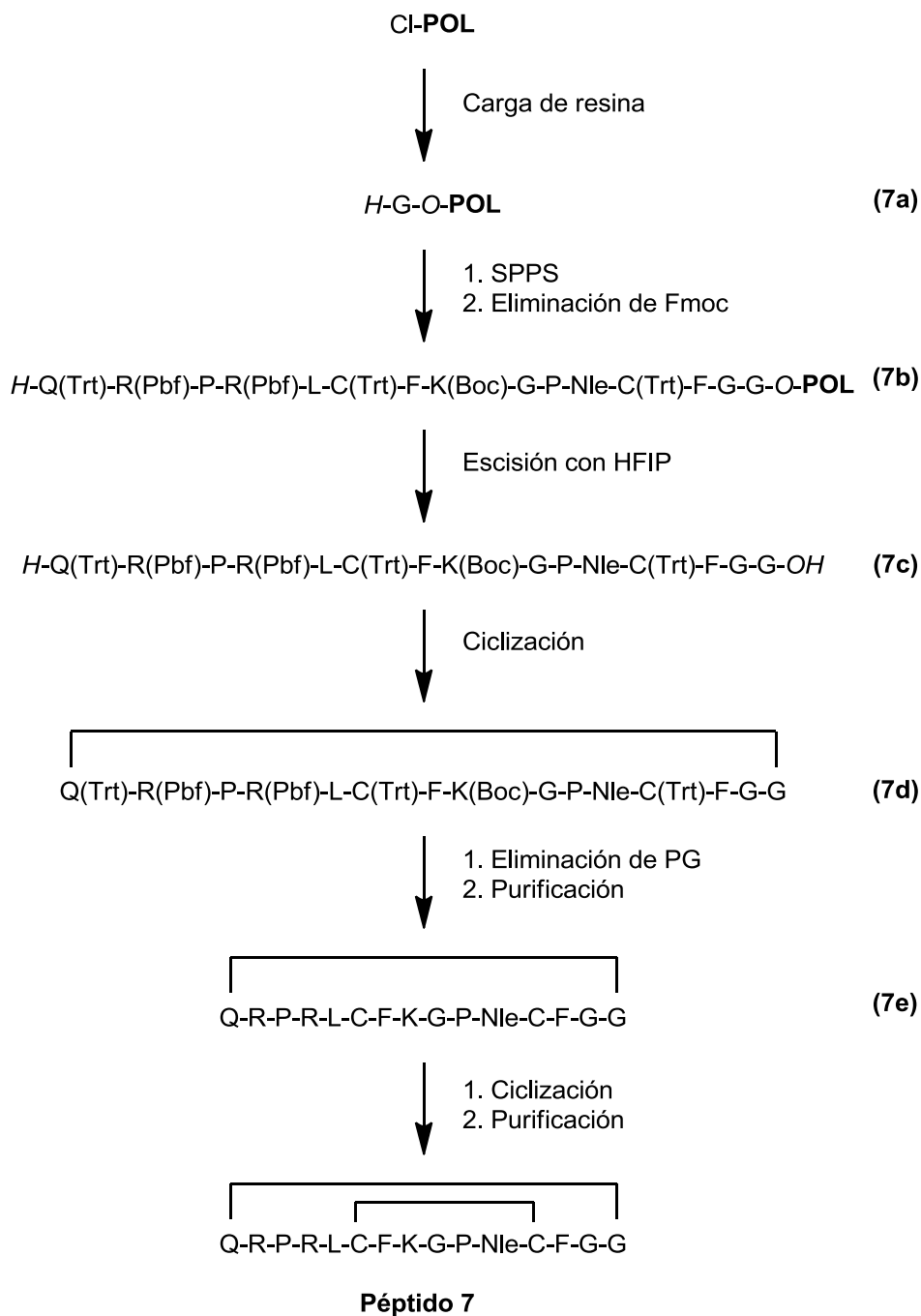
(Ciclización y eliminación de grupos protectores)

Una solución del Intermedio 5c (187 mg, 0,090 mmol), HATU (44,6 mg, 0,117 mmol) y HOAt (16,0 mg, 0,117 mmol) en DMF (35 ml) se trató con 2,6- lutidina (0,210 ml, 1,80 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo **Intermedio 5d** se disolvió en TFA / EDT / TIS al 95% (95:2,5:2,5) (5 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. La solución de escisión se vertió sobre heptano / éter dietílico frío (1:1) (30 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. La etapa de lavado se repitió una vez. El residuo se secó en alto vacío. El producto se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Péptido 5** como un sólido blanco (41,4 mg, 0.023 mol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: $t_R = 3,70$ min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}=484,5$; calculado: $[M+3]^{3+}=484,6$).

Péptido 7 Síntesis Q- R- P- R- L- C- F- K- G- P- Nle- C- F- G- G (Lactama extremo N-extremo C) (SEQ ID NO: 29)

- 116 -



(SEQ ID NOS 80, 80 ,80 29 y 29 respectivamente, en orden de aparición)

Preparación de **Intermedio 7a**

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

5

Se hizo reaccionar resina de cloruro de 2- clorotritilo (2,00 g, 3,20 mmol) con una solución de Fmoc- Gly- OH (0,476 g, 1,60 mmoles) en DCM (20 mL) y DIPEA (2,24 mL,

12,8 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermedio 7a** (2,22 g, carga = 0,68 mmoles / g).

- Preparación de **Intermedio 7b**

(Ensamblaje de péptido lineal y eliminación de Fmoc)

- 5 El Intermedio 7a (147 mg, 0,100 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	G	2 x 30 min	B
2	F	2 x 30 min	B
3	C(Trt)	2 x 30 min	B
4	Nle	2 x 90 min	B
5	P	2 x 30 min	B
6	G	2 x 90 min	B
7	K(Boc)	2 x 30 min	B
8	F	2 x 30 min	B
9	C(Trt)	2 x 30 min	B
10	L	2 x 30 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	P	2 x 90 min	B
13	R(Pbf)	4 x 1 h	B
14	Q(Trt)	2 x 90 min	B

Después del ensamblaje del péptido, se eliminó Fmoc por tratamiento repetitivo con piperidina/DMA (1:4). La resina se lavó con DMA para proporcionar el **Intermedio 7b**

- 10 (0,100 mmoles).

- Preparación de **Intermedio 7c**

(Escisión de HFIP a partir de la resina)

Se añadió HFIP / DCM (30:70) (3 ml) al **Intermedio 7b** (0,100 mmol) y la suspensión

se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución de escisión se separó por filtración y se agregó HFIP/DCM fresco (30:70) (3 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución de escisión se separó por filtración. La resina se lavó con DCM (2 x 3 mL). La escisión combinada y soluciones de lavado se concentraron a sequedad al vacío. El residuo se liofilizó a partir de tBuOH/H₂O (1:1) para proporcionar **Intermedio 7c** (203 mg, 0,067 mmol).

- Preparación de **Intermedio 7d**

(Ciclación del esqueleto)

Una solución del **Intermedio 7c** (203 mg, 0,067 mmol), HATU (33,3 mg, 0,088 mmol) y HOAt (11,9 mg, 0,088 mmol) en DMF (40 ml) se trató con 2,6- lutidina (0,157 ml, 1,35 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad al vacío para proporcionar **Intermedio 7d** (0,067 mmol).

- Preparación de **Intermedio 7e**

(Eliminación de los grupos protectores y luego purificación)

Una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (3 ml) se agregó al **Intermedio 7d** (0,067 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. La solución se vertió sobre una mezcla de heptano / éter dietílico frío (1:1) (30 ml), dando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (10 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. La etapa de lavado se repitió una vez. El sólido se secó en alto vacío. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio 7e** como un sólido blanco (33,6 mg, 0,017 mmol).

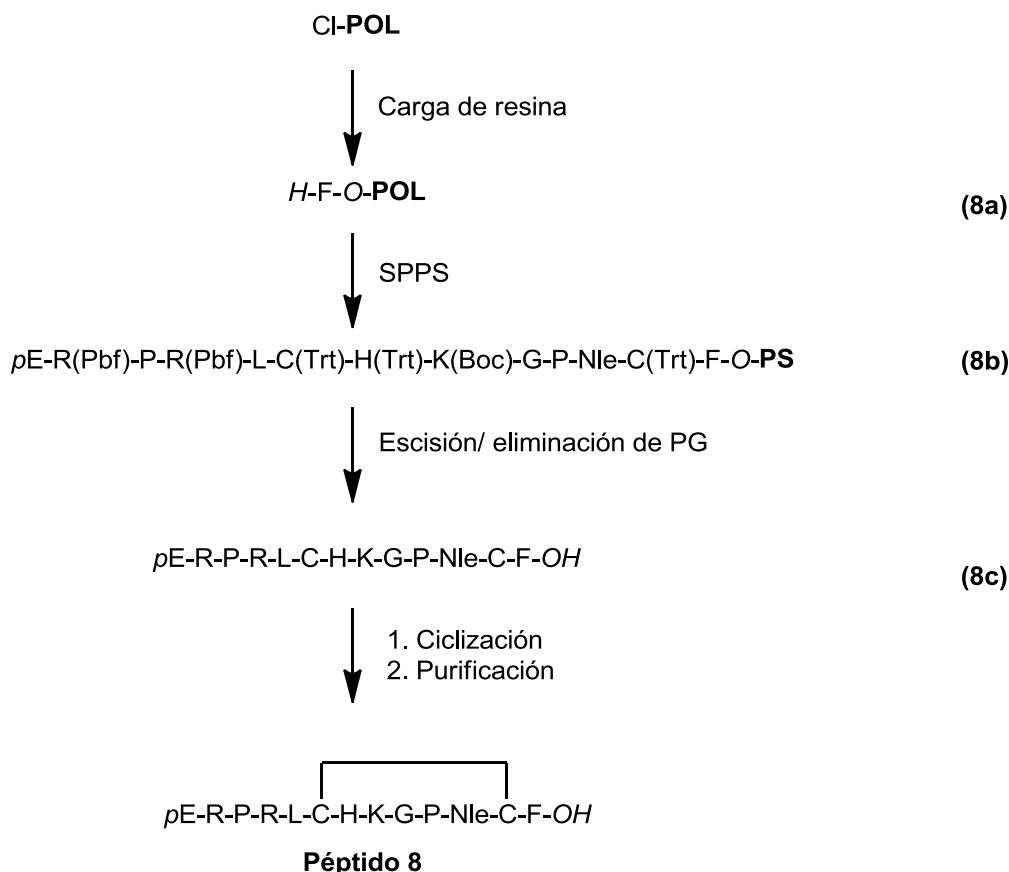
- Preparación del **Péptido 7**

(Ciclización y purificación)

Intermedio 7e (33,6 mg, 0,029 mmoles) se disolvió en H₂O/DMSO (9:1) (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 hora luego se concentró hasta sequedad al vacío. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar **Péptido 7** como un sólido blanco (21,0 mg, 0,010 mmol).

El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 3,85 min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: [M+3]³⁺=553.6; calculado: [M+3]³⁺=553.6).

Péptido 8 Síntesis de *p*E- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH (C⁶- C¹² disulfuro) (SEQ ID NO: 30)



(SEQ ID NOS 81, 30, y 30, respectivamente, en orden de aparición)

5 • Preparación de **Intermedio 8a**

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

A continuación, la resina se trató cuatro veces durante 10 min con una mezcla de piperidina / DMA (1:4) (400 ml) seguido por lavado con DMA (2 x 180 ml). Las soluciones de piperidina / DMA y soluciones de lavado de DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina. 1 ml de las soluciones combinadas se diluyó a 500 ml con MeOH y se

midio que la absorción UV a 299,8 nm era $A = 0,368$. Esto corresponde a una cantidad de Fmoc de 46,2 mmoles.

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

5 • Preparación de **Intermedio 8b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermedio 8a (2,64 g, 2,40 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	C(Trt)	2 x 30 min	D
2	Nle	2 x 15 min	A
3	P	2 x 15 min	A
4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2 x 15 min	A
6	H(Trt)	2 x 15 min	A
7	C(Trt)	2 x 60 min	D
8	L	2 x 15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2 x 15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	pE	2 x 15 min	A

10 • Preparación de **Intermedio 8c**

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

Intermedio 8b (2.40 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4x). Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (50 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió solución de escisión fresca (35 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 (35 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 agitada de heptano / dietil éter frío(1:1) (500 ml), proporcionando un precipitado.

- 5 La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después el precipitado se dejó sedimentar hacia abajo. El sobrenadante se aspiró con una frita. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (2 x 100 ml), el sobrenadante se aspiró con una frita. El sólido se secó en alto vacío para proporcionar **Intermedio 8c** como un sólido blancuzco (3,75 g, 1,88 mmol).

10 • Preparación del **Péptido 8**
(Ciclización y Purificación)

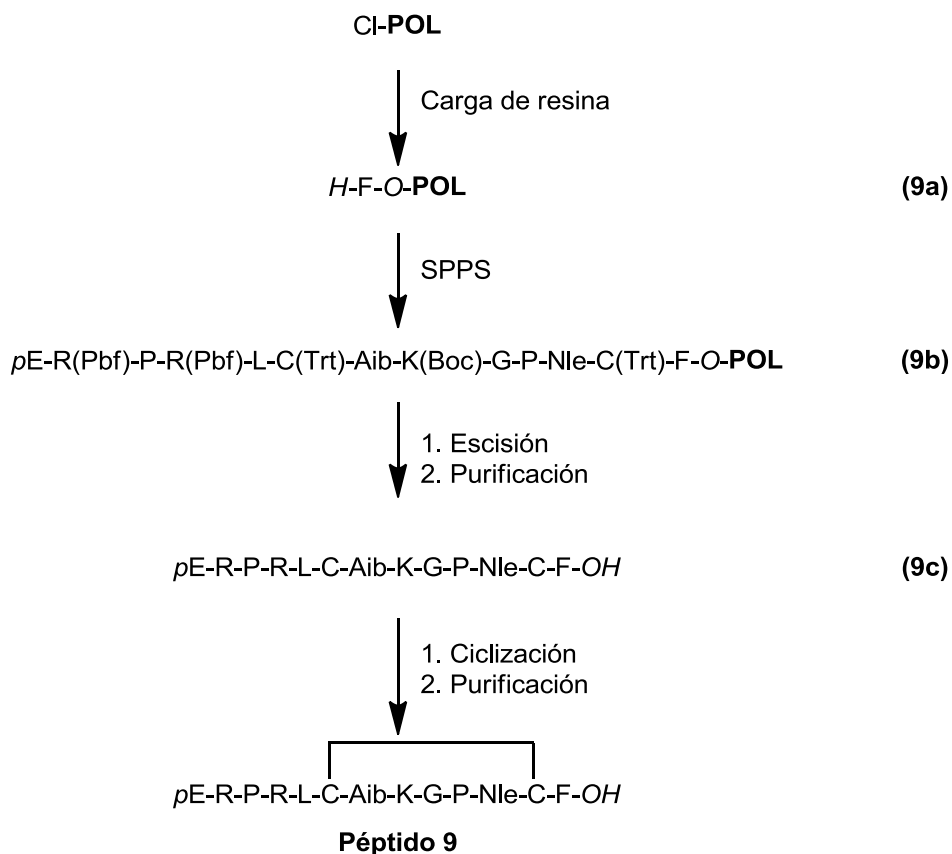
- Intermedio 8c** (3,75 g, 1,88 mmoles) se disolvió en H₂O (375 ml). Se añade una solución de I₂ a 50 mM en AcOH (45.1 ml, 2,26 mmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agita durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H₂O (5.64 ml, 2,82 mmol) para apagar el exceso de I₂. La solución se concentró hasta casi sequedad. La reacción se realizó en dos porciones: Escala de 0.118 mmol y escala de 1.69 mmol. Los crudos se combinaron para purificación El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar **Péptido 8** como un sólido blanco (1,53 g, 0.767 mmol).

- 20 El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 3,43 min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: [M+3]³⁺=512.4; calculado: [M+3]³⁺=512.6).

- Alternativamente, el **Péptido 8** crudo se disolvió en agua (500 ml de agua / mmol de polipéptido) y se convirtió en la sal de etilo con la ayuda de una resina de intercambio de iones (es decir, Amberlite IRA- 67 (Forma de Acetato) (200 g/mmol de polipéptido) y se purificó por HPLC preparativa (gel de sílice de fase inversa C8- modificado de Daisogel, gradiente: ACN/ H₂O: ACN al 3% y [mezcla de ácido acético al 0,3% / agua] al 97% hasta ACN al 12% y [mezcla de ácido acético al 0,3% / agua] al 88%) y se liofilizó para producir una sal de acetato del **Péptido 8** como un sólido blanco (rendimiento del 60 - 100%).

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

Péptido 9 Síntesis de *pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C-F-OH* (C^6 - C^{12} disulfuro)
(SEQ ID NO: 31)



(SEQ ID NOS 82, 31, y 31, respectivamente, en orden de aparición)

5 • Preparación de **Intermedio 9a**

(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 (10,0 g, 16,0 mmol) con una solución de *Fmoc-F-OH* (6,20 g, 16,0 mmoles) en DCM (100 mL) y DIPEA (11,2 mL, 64,0 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermedio 9a** (11,6 g, carga = 0,87 mmoles / g).

• Preparación de **Intermedio 9b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

El Intermedio 9a (345 mg, 0,300 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos PreludeTM. El acoplamiento se realizó como sigue:

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

- Preparación de **Intermedio 9c**

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

- 5 Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (9 ml) a **Intermedio 9a** (0,300 mmol) 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 (4 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 (4 ml) y la suspensión se agitó a
- 10 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) (100 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El residuo se lavó con heptano / dietil éter frío (1:1) (40 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en alto vacío.

El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio 9c** como un sólido blanco (188 mg, 0.103 mmol).

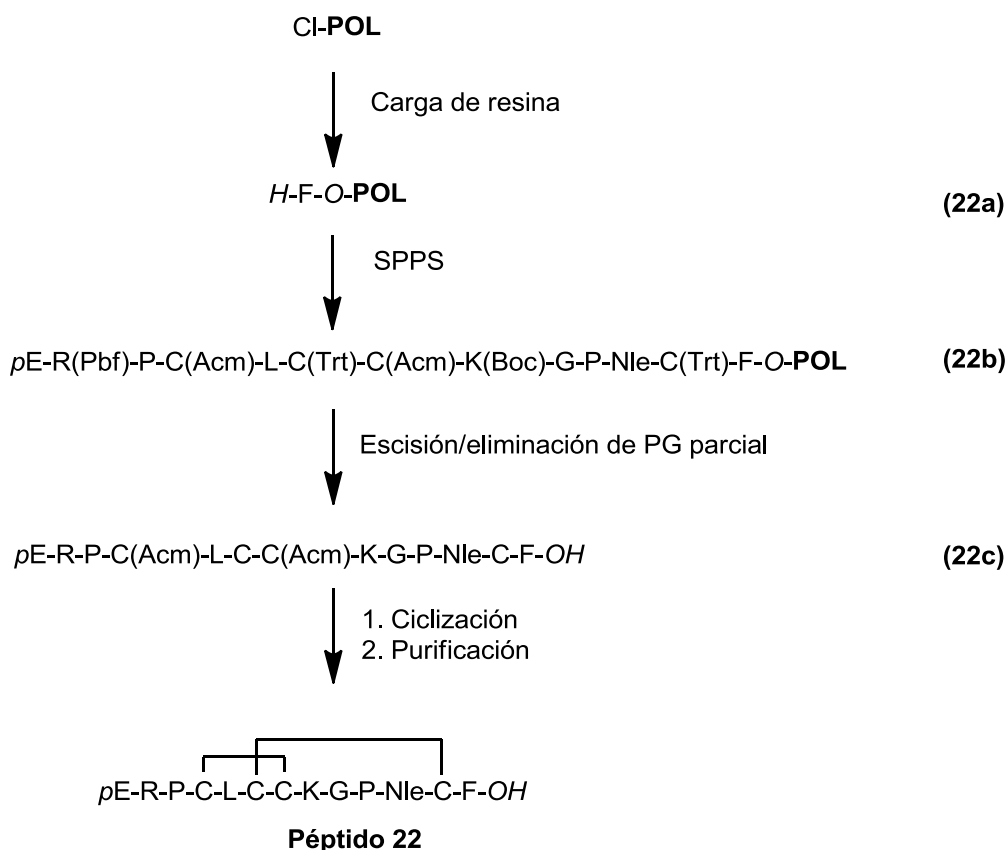
- Preparación del **Péptido 9**

(Ciclización y purificación)

5 **Intermedio 9c** (188 mg, 0,029 mmoles) se disolvió en H₂O/DMSO (9:1) (30 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 hora luego se concentró hasta sequedad al vacío. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar **Péptido 9** como un sólido blanco (97 mg, 0.053 mmol).

10 El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: $t_R = 3,77$ min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: $[M+3]^{3+}=495.2$; calculado: $[M+3]^{3+}=495.3$).

Péptido 22 Síntesis de *pE*-R- P- C- L- C- C- K- G- P- Nle- C- F- OH (C⁴- C⁷ y C⁶-C₁₂ disulfuro) (SEQ ID NO: 44)



(SEQ ID NOS 83, 84, y 44, respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermedio 22a**

(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 (10,0 g, 16,0 mmol) con una
 5 solución de Fmoc- F- OH (6,20 g, 16,0 mmoles) en DCM (100 mL) y DIPEA (11,2 mL, 64,0 mmol) en analogía con el procedimiento general descrito anteriormente para proporcionar el **Intermedio 22a** (11,6 g, carga = 0,87 mmoles / g).

- Preparación de **Intermedio 22b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

10 El Intermedio 22a (115 mg, 0,100 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	C(Trt)	2 x 15 min	B
2	Nle	2 x 15 min	B
3	P	2 x 15 min	B
4	G	2 x 90 min	B
5	K(Boc)	2 x 15 min	B
6	C(Acm)	2 x 15 min	B
7	C(Trt)	2 x 15 min	B
8	L	2 x 15 min	B
9	C(Acm)	2 x 15 min	B
10	P	2 x 15 min	B
11	R(Pbf)	4 x 1 h	B
12	pE	2 x 15 min	B

- Preparación de **Intermedio 22c**

(Escisión a partir de la resina con eliminación del grupo protector concomitante parcial)

15 **Intermedio 22b** (0.100 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4x). Se agregó una

mezcla de TFA / EDT acuoso al 95% (4:1) (0,750ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió una mezcla de TFA/H₂O (95:5) (2,18 ml) y TIS (75 μ L) a la suspensión y la agitación a temperatura ambiente se continuó durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración y se agregó a una mezcla TFA / EDT / TIS al 95%

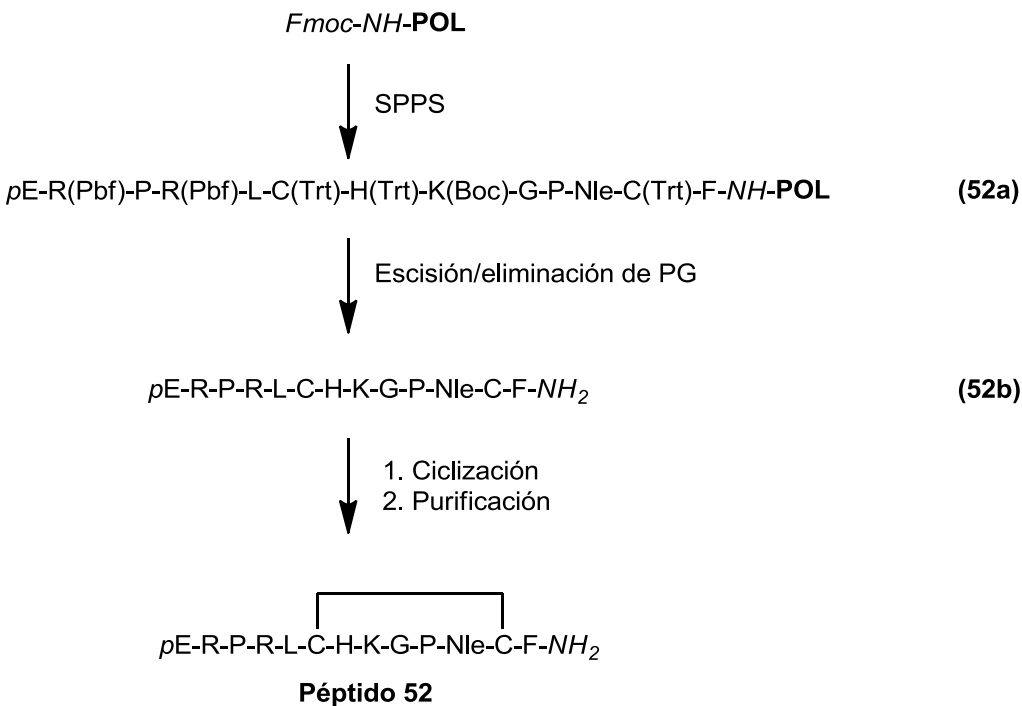
- 5 (95:2,5:2,5) (3 ml) a la resina. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió una solución fresca (3 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se separó por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron sobre 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 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. La etapa de lavado se repitió una vez. El residuo se secó en alto vacío. El producto crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio 22c** como un sólido blanco (51,1 mg, 0.028 mmol).

- 15 • Preparación del **Péptido 22**
(formación de un punto debida a los dos disulfuros)

- Intermedio 22c** (51,1 mg, 0,028 mmoles) se disolvió en AcOH (48 ml) y H₂O (12 ml). Se añadió una solución de 50 mM de I₂ en AcOH (1,12 ml, 56 μ moles) y la solución amarilla se agitó a temperatura ambiente. 50 mM adicionales de I₂ en AcOH (5,61 ml, 0,281 mmol) se añadieron por porciones durante 4 h. Después de 21 h, la mezcla de reacción se concentró a 2 ml en vacío y se añadió 1 M de ácido ascórbico en H₂O (6 ml) para apagar el exceso de I₂. El producto se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Péptido 22** como un sólido blanco (19,3 mg, 0.012 mmol).

- 25 El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 4,16 min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: [M+2]²⁺=723.7; calculado: [M+2]²⁺=723.8).

Péptido 52 Síntesis de pE- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- NH₂ (C⁶- C¹² disulfuro) (SEQ ID NO: 74)



(SEQ ID NOS 85, 74 y 74, respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermedio 52a**

(Ensamblaje de péptido lineal)

5 Resina Rink- Amida- AM- PS protegida por Fmoc (217 mg, 0,100 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	F	2 X 15 min	A
2	C(Trt)	2 X 30 min	D
3	Nle	2 X 15 min	A
4	P	2 X 15 min	A
5	G	2 x 30 min	A
6	K(Boc)	2 X 15 min	A
7	H(Trt)	2 X 15 min	A
8	C(Trt)	2 x 1 h	D

9	L	2 X 15 min	A
10	R(Pbf)	4 x 1 h	A
11	P	2 X 15 min	A
12	R(Pbf)	4 x 1 h	A
13	pE	2 X 15 min	A

- Preparación de **Intermedio 52b**

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

Se añadió una mezcla de TFA / EDT / TIS acuoso al 95% (95:2,5:2,5) (3 ml) a

- 5 **Intermedio 52a** (0,1 mmol) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución de escisión se separó por filtración, y se añadió solución de escisión fresca (2 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, después la solución de escisión se separó por filtración. Se añadió solución fresca (2 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron sobre una
- 10 mezcla de heptano / éter dietílico 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 ml), la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se vertió. El sólido se secó en alto vacío. El producto crudo **Intermedio 52b** fue utilizado en el siguiente paso sin purificación.

15

- Preparación del **Péptido 52**

(Ciclización y purificación)

- Intermedio 52b** (0,100 mmoles) se disolvió en H₂O (20 ml). Se añade una solución de I₂ a 50 mM en AcOH (2,4 ml, 0,120 mmol) en una porción a la solución agitada y la solución se agita durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H₂O
- 20 (0,30 ml, 0,300 mmol) para apagar el exceso de I₂. La solución se concentró hasta casi sequedad. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar **Péptido 52** como un sólido blanco (50,5 mg, 0.025 mmol).

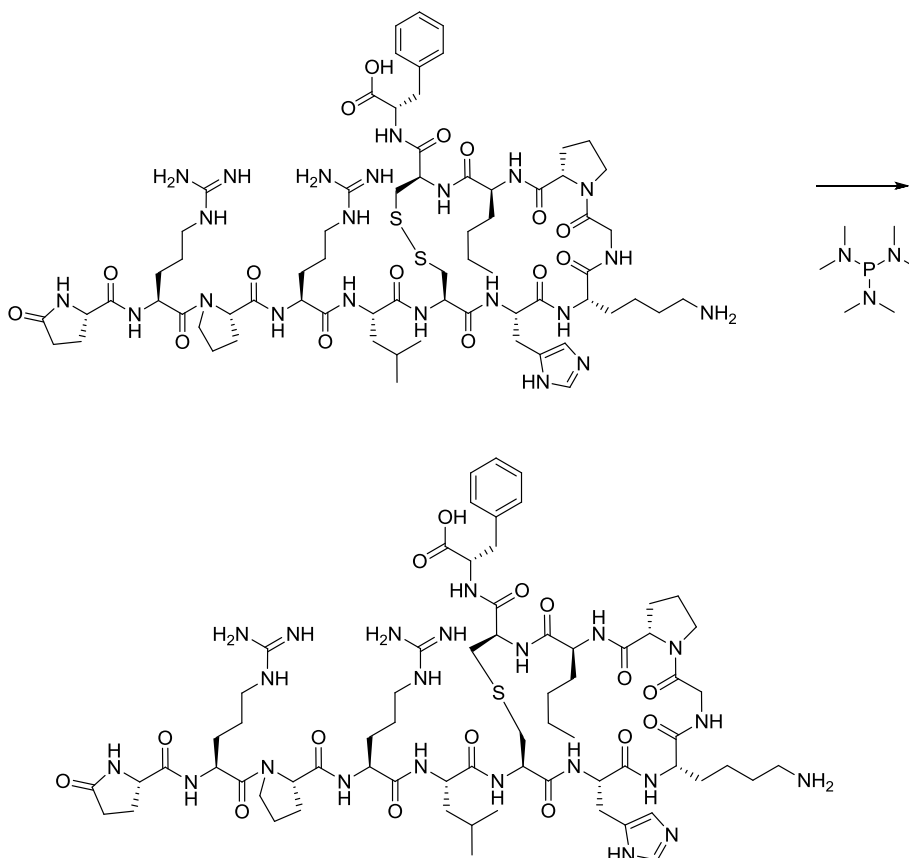
El producto puro se analizó por HPLC analítica (Método analítico A: t_R = 3,22 min) y UPLC- MS (Método analítico C; medido: [M+3]³⁺=512.3; calculado: [M+3]³⁺=512.3).

- 25 Los otros péptidos se sintetizaron en analogía:

- **Péptidos 2 a 4** se sintetizaron en analogía al **Péptido 1**.
- **Péptido 6** se sintetizó en analogía al **Péptido 5**.
- **Péptidos 10 a 21** se sintetizaron en analogía al **Péptido 9**.
- **Péptido 23** se sintetizó en analogía al **Péptido 22**.
- **Péptidos 24 a 51** se sintetizaron en analogía al **Péptido 8**.
- **Péptido 53** se sintetizó en analogía al **Péptido 52**.

5

Péptido 54: *pE*- R- P- R- L- C- H- K- G- P- Nle- C- F- OH (SEQ ID NO: 76) con un enlace de monosulfuro entre las 2 cisteínas en la posición 6 y 12 [C^6 - C^{12}]



10

La mezcla del **Péptido 8** sales de TFA del ácido (S)- 2- ((3S,6R,11R,14S,17S,25aS)- 14- ((1H- imidazol- 5- il)metil)- 17- (4- aminobutil)- 3- butil- 11- ((S)- 2- ((S)- 5- guanidino- 2- ((S)- 1- ((S)- 5- guanidino- 2- ((S)- 5- oxopirrolidina- 2- carboxamido)pentanoil)pirrolidina- 15- 2- carboxamido)pentanamido)- 4- metilpentanamido)- 1,4,12,15,18,21- hexaoxodocosahidro- 1H- pirrolo[2,1- j][1,2,5,8,11,14,17,20]dithiahexaazaciclotricosina- 6- carboxamido)- 3-

fenilpropanóico (30 mg, 0,015 mmol) y N,N,N',N',N'', N''- hexametilfosfinetriamina (12,3 mg, 0,075 mmol) en PBS, pH 9,2 buffer (1 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa (C18 Sunfire, TFA al 0,1% en agua / MeCN) dos veces, y la fracción del producto se liofilizó para proporcionar el **Péptido 54** como un polvo blanco (4 mg, 13,4%). $[M+2H]^{2+}$ (calc.)=752.88, $[M+2H]^{2+}$ (medido)=752.40, $[M+3H]^{3+}$ (calc.)=502.26, $[M+3H]^{3+}$ (medido)=501.94. HPLC (método analítico B), t_R =6.93 min.

Los Péptidos 1 a 54 pueden purificarse y aislarse como se describió anteriormente y/o mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales tales como extracción de solventes, cromatografía en columna, cromatografía líquida 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. Por lo tanto, los **Péptidos 1 a 54** se pueden convertir en sus sales correspondientes (por ejemplo, sal clorhídrica, de hidrobromuro, sulfato, fosfato, citrato, acetato, lactato, u otra sal farmacéutica adecuada para inyección) con una proporción polipéptido:sal que varía entre 1:1 y 1:4. Por ejemplo, los **Péptidos 1 a 54** se pueden disolver en agua y se pueden convertir en una sal utilizando resinas de intercambio de iones. A la inversa cuando el péptido aislado es una sal, éste puede convertirse en el péptido libre mediante un método conocido o directamente en una sal diferente con la ayuda de resinas de intercambio iónico.

Constructo 1 y 2 de Enlazador- Péptido se sintetizaron como sigue:

Los productos Péptido- Enlazador se analizaron mediante HPLC analítica utilizando detección UV a $\lambda=214$ nm (Columna: Xbridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 μ m; Parte n°: 186003612) Las fases móviles constaron de eluyente A (TFA al 0.1% en H₂O), eluyente B (TFA al 0,4% en ACN). La caracterización adicional de los productos se realizó mediante UPLC- MS (Columna: Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7. μ m, 2.1x50mm, Parte n°: 186002350) equipado con un detector de arreglo de diodo y utilizando ionización de electrospray. Las fases móviles constan de Eluyente A: FA al 0,05% + acetato de amonio 3,75 mM en agua, Eluyente B: FA al 0,04% en ACN.

Los péptidos se sintetizaron mediante química Fmoc de fase sólida. Los péptidos se ensamblaron en sintetizador de péptidos de microondas Liberty (Cem Corporation, Carolina del Norte, Estados Unidos). Los péptidos con un ácido carboxílico libre en el extremo C se

sintetizaron a partir de cloruro- PS- resina de clorotritilo (AnaSpec, Inc., California, Estados Unidos).

Los péptidos se purificaron mediante HPLC preparativa de fase inversa. Se utilizaron las siguientes columnas: Columna Waters SunFire Prep C18 OBD, 5 μ m, 30x50 mm, Part No. 186002570.

Las fases móviles constaron de eluyente A (0.1% TFA en H₂O) 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/H₂O.

Los productos se analizaron mediante HPLC analítica utilizando detección UV a $\lambda=214$ nm (Columna: Xbridge BEH300 C18 (100x4.6 mm), 3 μ m; Parte n°: 186003612) Las fases móviles constaron de eluyente A (TFA al 0.1% en H₂O), eluyente B (TFA al 0,1% en ACN). La caracterización adicional de los productos se realizó mediante UPLC- MS (Columna: Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7. μ m, 2.1x50mm, Parte n°: 186002350) equipado con un detector de arreglo de diodo y utilizando ionización de electrospray. Las fases móviles constan de Eluyente A: FA al 0,05% + acetato de amonio 3,75 mM en agua, Eluyente B: FA al 0,04% en ACN.

Los constructos de péptido- enlazador que están ejemplificados a continuación se sintetizaron utilizando los procedimientos generales descritos a continuación. Los extremos N o C no sustituidos se indican por *H* o *OH* itálicas pequeñas, respectivamente.

Métodos Analíticos para el Constructo 1 y 2 de Péptido- Enlazador

1) Método Analítico de UPLC- MS D

- Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7. μ m, 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 44% en 1.7 min

2) UPLC- HRMS - Método Analítico E

- Waters Acquity UPLC® BEH C18 1,7. μ m, 2.1x50mm, Parte n°: 186002350
- Eluyente A: FA al 0,1%; Eluyente B: FA al 0,1% en ACN

- Flujo: 1,0 ml/min
- Temperatura: 50 ° C
- Gradiente: 2 a 98% en 4.4 min

3) UPLC- MS - Método Analítico F

- 5 • columna Waters Acquity UPLC® BEH300 SEC guard, 4.6x30mm; Parte n°: 186005793
- Eluyente A: TFA al 0,1% en agua / Eluyente B: FA al 0,04% en ACN
 - Flujo: 1,0 ml/min
 - Gradiente: B al 50% durante 6 min

10 4) UPLC- MS - Método Analítico G

- Waters Acquity UPLC® ProSwift RP- 3, 1,7.µm, 4.6x50mm, Parte n°: 064298
- Eluyente A: FA al 0,1% en agua; Eluyente B: FA al 0,08% en ACN
- Flujo: 2.0 ml/min (B al 3 a 80% en 2min) - flujo 1.8mL/min
- Temperatura: 40 ° C
- 15 • Gradiente: 2 a 98% en 3 min

Procedimientos Generales para el Constructo 1 y 2 de Péptido- Enlazador

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

20 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 19 h. La resina se drenó y luego se lavó a fondo secuencialmente con DCM / MeOH / DIPEA (17:2:1), DCM, DMA,

25 DCM.

30 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 (Va) de esta solución se diluyó adicionalmente a 250 mL

(Vt) con MeOH. La absorción UV se midió a 299,8 nm contra una referencia de MeOH, proporcionando la absorción A. La resina se lavó a fondo secuencialmente con DMA, DCM, DMA, DCM y se secó a alto vacío a 40 ° C, proporcionando mg de resina.

La carga de la resina se calcula según la fórmula:

$$5 \quad \text{Carga [mol / g]} = (A \times V_t \times V) / (d \times \epsilon \times V_a \times m)$$

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

2) Síntesis de péptidos de fase sólida sobre sintetizador Liberty™

Ciclo de Síntesis

La resina se lavó con DMF y DMC. Fmoc se eliminó mediante tratamiento con
 10 piperidina al 20% o 4- Me- piperidina al 20% / DMF (típicamente 7 ml por 0,1 mmol dos veces). La resina se lavó con DMF y . 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
 15 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 y DMC.

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

20 La resina (0,1 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h con TFA/TIS/DTT acuoso (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
 25 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.

4) Formación de Disulfuro

Métodos de Ciclización:

El péptido precursor lineal completamente desprotegido (1 equivalente) se disolvió en H₂O para proporcionar típicamente una concentración de 10- 25 mM. Se añade una solución de I₂ a 50 mM en AcOH (1- 2 eq.) en una porción a la solución agitada y la reacción se agita a temperatura ambiente hasta que la conversión se logró. Se añadió ácido ascórbico a 0,5 M en H₂O para apagar el exceso de I₂.

Construto 1 de Péptido- Enlazador: MPA- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- Q- R- P- R- L- C*-H- F- G- P- Nle- C*- f- OH (SEQ ID NO: 86) en donde MPA es ácido 3- maleimidopropiónico



Construto 1 de Péptido-Enlazador

(SEQ ID NOS 87, 86, 86, y 86, respectivamente, en orden de aparición)

- Preparación de **Intermedio 1a**

(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
 5 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 **Intermedio 1a** (5,87 g, carga = 0,897 mmoles / g).

- Preparación de **Intermedio 1b**

(Ensamblaje de péptido lineal)

10 • **Intermedio 1a** (0,250 mmol) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en el sintetizador de péptidos de microondas Liberty™. El acoplamiento se realizó como sigue:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Temperatura °C	Potencia Microondas
1	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
2	Nle	1 x 7,5 min	50	20
3	P	1 x 7,5 min	50	20
4	G	1 x 7,5 min	50	20
5	F	1 x 7,5 min	50	20
6	H(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
7	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
8	L	1 x 7,5 min	50	25
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0
		2 x 7,5 min	50	25
10	P	1 x 7,5 min	50	25
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0

		2 x 7,5 min	50	25
12	Q(Trt)	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	O2Oc	1 x 7,5 min	50	25

- Preparación de **Intermedio 1c**

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

- 5 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 añadió a **Intermedio 1a** (0,25 mmol) y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante 5 h. La solución de escisión se separó por filtración y la resina se lavó con TFA acuoso al 95%. Las soluciones de escisión y lavado combinadas se vertieron lentamente sobre éter dietílico frío (40 ml), proporcionando un precipitado. La suspensión se centrifugó y
- 10 el sobrenadante se vertió. Se añadió dietil éter (40 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 tres veces. El sólido se secó en alto vacío. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio 1c** como un polvo blanco (178 mg, 71 µmol).
- 15 El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico D; t_R=1,33 min; medido: [M+2H]²⁺=1078.1; calculado: [M+2H]²⁺=1078.3).

Preparación de **Intermedio 1d**

(Ciclización y purificación)

- 20 Se disolvió **Intermedio 1c** (178 mg, 71 µmol) en H₂O (2,0 ml). Se añadió una solución de I₂ a 50 mM en AcOH (1,85 ml, 93 µmol) 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 H₂O para apagar el exceso de I₂. El crudo se aisló por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Intermedio**

1d como un polvo blanco (92 mg, 35 μ mol).

El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico D; t_R =1,44 min; medido: $[M+2]^{2+}$ = 1077.4; calculado: $[M+2]^{2+}$ =1077.2).

5 Preparación del **Constructo 1 de Péptido- Enlazador**

Una mezcla de la Preparación del **Intermedio 1d** (30 mg, 12 μ mol), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3 - (maleimido) propiónico (3,06 mg, 12 μ mol) y una solución de bicarbonato de sodio (50 μ l, 1 M) en DMF (1 ml) se agitó a 25 ° C durante 2 horas, La mezcla de reacción se diluyó con MeOH y se filtró. La solución se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Constructo 1 de Péptido- Enlazador** como un polvo blanco (12 mg, 4,54 μ mol).

El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico D; t_R =1,59 min; medido: $[M+2]^{2+}$ = 1153.0; calculado: $[M+2]^{2+}$ =1152.8).

15 **Constructo 2 de Péptido- Enlazador:** PPA- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- Q- R- P- R- L- C*- H- F- G- P- Nle- C*- f- OH (SEQ ID NO: 86) en donde PPA es ácido 3- (2-piridilditio)propiónico

Una mezcla de la preparación del **Intermedio 1d** (27 mg, 10,4 μ mol), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3 - (2- piridilditio)propiónico (5,7 mg, 18 μ mol) y una solución de bicarbonato de sodio (72 μ l, 1 M) en DMF (1 ml) se agitó a 25 ° C durante 2 horas, La mezcla de reacción se diluyó con MeOH y se filtró. La solución se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó a partir de ACN/H₂O para proporcionar el **Constructo 2 de Péptido- Enlazador** como un polvo blanco (10 mg, 3,71 μ mol).

El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico D; t_R =1,71 min; medido: $[M+2]^{2+}$ = 1175.7; calculado: $[M+2]^{2+}$ =1175.9).

Ejemplo 1: Albumina- MPA- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- O₂Oc- Q- R- P- R- L- C*- H- F- G- P- Nle- C*- f- OH (SEQ ID NO: 86)

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- maleimidohexanoico (13 µg) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 2 h. UPLC- MS (Método analítico G) mostró únicamente la formación monoadducto, 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 μ L de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3- maleimidopropiónico (25 μ g) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante la noche. UPLC- MS (Método analítico G) mostró únicamente la formación monoadducto, 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 centrifugación 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 μ L de PBS a pH 7,4 en un tubo de 2 ml se añadió una solución de ácido 3- maleimidopropiónico (15 μ g) en agua. La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 1 h. UPLC- MS (Método analítico G) mostró únicamente la formación monoadducto, medido: 66649.0; esperado: 66648. 66608.0; esperado: 66606.

Paso 2: Conjugación del Constructo de Péptido- Enlazador/ Albúmina

Una solución de HSA desprotegido (97 mg) en búfer PBS (6 ml) se trata con una solución de **Constructo 1 de Péptido- Enlazador** (11,6 mg en agua). La solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante la noche, luego, se desaló y se lavó con 6 filtros de

centrífugación Amicon Ultra- 0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 13K 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 13K g durante 10 min) y el proceso de lavado se repitió 6 veces. El conjugado 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 (90,5 mg).

El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico G; medido: 68742.5; esperado: 68741).

- 10 **Ejemplo 2:** Albumina- TPA- O2Oc- O2Oc- O2Oc- O2Oc- Q- R- P- R- L- C*- H- F- G- P- Nle- C*- f- OH (SEQ ID NO: 86) en donde TPA es: Ácido 3- mercaptopropanóico

Se añadió una solución de HSA descapsulado (65,8 mg) en búfer de PBS (1 ml) por porciones (100 ul en cada 30 min) una solución de **Constructo 2 de Péptido- Enlazador** (8 mg) y bicarbonato de sodio (8,92 uL, 1 M) en búfer de PBS (1 ml). Después de la adición, la solución resultante se sacudió a temperatura ambiente durante la noche, luego, se desaló y se lavó con 4 filtros de centrífugación Amicon Ultra- 0.5 (10K MWCO). Los filtros se centrifugaron a 13K 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 13K g durante 10 minutos) y el proceso de lavado se repitió 5 veces. El conjugado 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 (65,6 mg).

El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico G; medido: 68677; esperado: 68678).

- 25 **Ejemplo 3:** Albumina- MPA- NHCH₂CH₂CH₂- OCH₂CH₂OCH₂CH₂O- CH₂CH₂CH₂NH- C(O)CH₂CH₂C=O- A- R- P- R- L- S- H- K- G- P- Nle- P- F- OH (SEQ ID NO:88)

El Ejemplo 3 se sintetizó como ejemplo 1. El producto puro se analizó por UPLC- MS (Método analítico G, medido: 68367; esperado: 68366)

- 30 **Clonación de Constructo de Fc- Apelina:**

Los fragmentos de ADN a continuación se generaron mediante técnicas de PCR estándar utilizando el vector pPL1146 como una plantilla con los siguientes cebadores: Se diseñó un cebador 5' que contiene un sitio NheI seguido por la secuencia correspondiente al extremo 5' de la Fc humana contenida en el vector pPL1146. Se diseñaron cebadores 3' que
5 contenían un sitio EcoRI, secuencia de Apelina para el constructo apropiado, un enlazador de serina glicina y secuencia complementaria al extremo 3' de la Fc humana contenida en pPL1146. Después de la amplificación, cada uno de los cuatro fragmentos se digirió por restricción con enzimas de restricción de NheI y EcoRI, aislado y purificado, y se ligó en
10 vector pPL1146 digerido y purificado de la misma manera. Las ligaciones se transformó en células E. coli y colonias que contienen el plásmido correcto se identificaron por secuenciación de ADN. Las secuencias mostradas son para la cadena con sentido y corre en la dirección 5' y 3'.

Fusión de Fc- apelina (ejemplo 4 a Ejemplo 7)

15 Expresión y Purificación de Proteínas de Fc- Apelina:

ADN plásmido de expresión se transfectó en células HEK293T a una densidad de ~10 E6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Gibco) en matraz de 3 L durante 3 días a 37 ° C.

Proteínas de Fc- apelina fueron purificados a partir de medio condicionado clarificado
20 con proteína A sefarosa FF. Brevemente 500 ml de medio condicionado fue unido por lotes a 2 ml de Sefarosa de Proteína A a 4 ° C. durante la noche. La sefarosa de proteína A se transfirió a una columna desechable y se lavó extensivamente con PBS. Proteínas de Fc- apelina se eluyeron con glicina a 0,1 M, pH 2,7, se neutralizó con Tris- HCl a 1 M, pH 9 y se dializó contra PBS. Los rendimientos fueron de 10 a 20 mg por 500 ml de medio
25 acondicionado y los niveles de endotoxinas eran bajos (<1 EU/ mg), medidos por la prueba de Charles River ENDOSAFE PTS.

Control de Calidad de Proteínas de Fc- Apelina:

LC / MS de proteínas de Fc- Apelina nativa: Los picos fueron heterogéneos y
30 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 Fc- Apelina reducidas, N- desglucosiladas por N:

proporcionó picos agudos. El peso molecular para Fc- apelina 3 y 4, y Fc- Cys era como se esperaba, mientras que los pesos moleculares de Fc- apelina 1 y 2 y Cys- Fc fueron

- 5 consistentes con la escisión del aminoácido de extremo C. 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.

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

Secuencia de Nucleótidos

Fusión de Fc- Apelina: Ejemplo 4 (SEQ ID NO: 89)

GCTAGCCACCATGGAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCAGCACCA
15 GAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACAC
TGATGATCTCAAGGACCCCAGAAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGA
GGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCT
AAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTC
CTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTG
20 AGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGG
CAGCCAAGAGAACCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACA
AAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGACATCG
CAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACACCCC
CTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAA
25 AGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAG
GCAGCGGCGGTGGAGGCAGCCAGCGGCCCCGGCTGAGCCACAAGGGCCCCATGC
CCTTCTAAGAATTC

- 30 Fusión de Fc- Apelina: Ejemplo 5 (SEQ ID NO: 90)

GCTAGCCACCATGGAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCAGCACCA

GAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACAC
TGATGATCTCAAGGACCCCAGAAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGA
GGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCT
AAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTC
5 CTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTG
AGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGG
CAGCCAAGAGAACCCCGAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACA
AAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGACATCG
CAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACACCCC
10 CTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAA
AGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAG
GCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGAAGCCAGCGGCCCCCGGCTGAGCC
ACAAGGGCCCCATGCCCTTCTAAGAATTC

15

Fusión de Fc- Apelina: Ejemplo 6 (SEQ ID NO: 91)

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCCAGCACCA
GAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACAC
20 TGATGATCTCAAGGACCCCAGAAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGA
GGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCT
AAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTC
CTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTG
AGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGG
25 CAGCCAAGAGAACCCCGAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACA
AAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGACATCG
CAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACACCCC
CTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAA
AGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
30 ACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAG
GCAGCGGCGGTGGAGGCAGCCAGCGGCCCCCGGCTGTGCCACAAGGGCCCCATGT
GCTTCTAAGAATTC

Fusión de Fc- Apelina: Ejemplo 7 (SEQ ID NO: 92)

GCTAGCCACCATGGAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTG
GGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCAGCACCA
5 GAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACAC
TGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGA
GGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCT
AAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTC
CTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTG
10 AGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGG
CAGCCAAGAGAACCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACA
AAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGACATCG
CAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGACCACACCCC
CTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAAA
15 AGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
ACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAG
GCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGAAGCCAGCGGCCCGGCTGTGCC
ACAAGGGCCCCATGTGCTTCTAAGAATTC

20 Secuencias Cebadoras:

FcA 1- fwd	GCTTGCTAGCCACCATGGAACTG (SEQ ID NO: 93)
FcA 1- rev	GTTGATTGAATTCTTAGAAGGGCATGGGGCCCTTGTTGGCTCAGCCGGGGC CGCTGGCTGCCTCCACCGCCGCTGCCTCCGCCACCTTTGCCTGGACTCAGA GACAGGG (SEQ ID NO: 94)
FcA 2- rev	GTTGATTGAATTCTTAGAAGGGCATGGGGCCCTTGTTGGCTCAGCCGGGGC CGCTGGCTTCCGCCACCTCCGCTGCCTCCACCGCCGCTGCCTCCGCCACCT TTGCCTGGACTCAGAGACAGGG (SEQ ID NO: 95)

FcA	GTTGATTGAATTCTTAGAAGCACATGGGGCCCTTGTGGCACAGCCGGGGC
3- rev	CGCTGGCTGCCTCCACCGCCGCTGCCTCCGCCACCTTTGCCTGGACTCAGA GACAGGG (SEQ ID NO: 96)
FcA	GTTGATTGAATTCTTAGAAGCACATGGGGCCCTTGTGGCACAGCCGGGGC
4- rev	CGCTGGCTTCCGCCACCTCCGCTGCCTCCACCGCCGCTGCCTCCGCCACCT TTGCCTGGACTCAGAGACAGGG (SEQ ID NO: 97)

Ejemplo 4: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
5 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
251 GSGGGGSQRPRLSHKGPMPE (SEQ ID NO: 98)

en donde GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) representa el enlazador y

10 QRPRLSHKGPMPE (SEQ ID NO: 19) es el polipéptido.

Ejemplo 5: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
15 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
251 GSGGGGSGGGGSQRPRLSHKGPMPE (SEQ ID NO: 99)

en donde GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y

20 QRPRLSHKGPMPE (SEQ ID NO: 19) es el polipéptido.

Ejemplo 6: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
25 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS

201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG

251 GSGGGGSQRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 100)

en donde GSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) representa el enlazador y

QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el polipéptido.

5

Ejemplo 7: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT

51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

10 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS

201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG

251 GSGGGSGGGG GSQRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 101)

en donde GSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y

QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el polipéptido.

15

Clonación de Constructo de Fc- Apelina:

El fragmento de ADN de Fc- Apelina mostrado a continuación se generó por técnicas PCR estándar utilizando el vector pPL1146 que contiene la secuencia de señal de Ig Kappa de ratón seguido de la Fc humana corriente abajo de un promotor de CMV, como una plantilla. Se diseñó un cebador delantero (5'- GCT TGC TAG CCA CCA TGG AAA CTG- 3') (SEQ ID NO: 93) que contiene un sitio NheI seguido por las secuencias correspondientes al extremo 5' de la secuencia de señal contenida en el vector pPL1146. Se diseñó un cebador inverso (5'- GTT GAT TGA ATT CTT AGA ACA TGG AGC GGC CCT TGT GGC GCC ACA GGG GCC GCT TTC GGC CAC CTC CGC CGC TGC CAC CTC CGC CGC TGC CAC CTC CGC CGC CTG CTG CAG TCA GAG ACA GGG- 3') (SEQ ID NO: 102) que contenía un sitio de EcoRI, secuencia de apelina, un enlazador de serina glicina y secuencia complementaria para el extremo 3' de la Fc humana contenida en pPL1146. Después de la amplificación, el fragmento se digirió por restricción con NheI y EcoRI, aislado y purificado a partir de un gel de agarosa, y se ligó en vector pPL1146 digerido y purificado de la misma manera. Las ligaciones se transformó en células E. coli DH5α y colonias que contienen el plásmido correcto se identificaron por secuenciación de ADN. Modificaciones en la fusión Fc, enlazador y / o secuencias de apelina de otras fusiones de Fc- apelina mostradas han sido generadas por los

20

25

30

protocolos de mutagénesis dirigido a sitio estándar usando el Ejemplo 9 como una plantilla. Ejemplo 8 que contiene una fusión de Fc en el extremo C de apelina fue optimizado en codones por síntesis de genes (GeneArt) y el inserto fue clonado en el vector pPL1146 como se describe anteriormente. Las secuencias mostradas son para la cadena con sentido y corre en la dirección 5 'y 3'.

Expresión y Purificación de Proteínas de Fc- Apelina:

ADN plásmido de expresión de Fc- Apelina se transfectó en células HEK293T a una densidad de 1×10^6 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- Apelina 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- Apelina 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- Apelina:

LC / MS de proteínas de Fc- Apelina nativa: 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 proteína de Fc- Apelina reducida, N- deglicosilada: El pico era agudo. El peso molecular para el Ejemplo 8 fue 488 daltons menos que el teórico, 130 daltons de los cuales son probables debido a la pérdida del residuo de lisina de extremo C de Fc. El peso molecular para los ejemplo 9 a ejemplo 19 era 2 o 3 daltons menos de lo esperado, probablemente debido a la reducción de cisteína x2 o reducción de Cys X2 con una modificación adicional (es decir, la desamidación de Asn a Asp), respectivamente.

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.

Secuencia de Nucleótido

Ej 8	GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTG TGGGTGCCAGGCAGCACAGGCGATAAGGGCAGCCAGAGGCCTAGACTG TGCCACAAGGGCCCCATGTGCTTTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCG GCAGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGC TGGCGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTA CCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGT ACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTG CTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACA AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG CAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 103)
Ej 9	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA

	GAGAACCCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGG TGGCGGAAGCCAGCGGCCCCCGGCTGTGCCACAAGGGCCCCATGTGCTTC TAAGAATTC (SEQ ID NO: 104)
Ej 10	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTAGCCAGCGGCCCCCGGCTGTGCCACAAGGGC CCCATGTGCTTCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 105)
Ej 11	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT

	GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCCAGCGGCCCCGGCTGTGCCACAAGGGC CCCATGTGCTTCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 106)
Ej 12	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAGGCAGCCAGCGGCCCCGGCTGTGC CACAAGGGCCCCATGTGCTTCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 107)
Ej 13	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCC

	AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGG AGGTGGCGGAAGCCAGCGGCCCCGGCTGTGCCACAAGGGCCCCATGTGC TAGTAAGAATTC (SEQ ID NO: 108)
Ej 14	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCYGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC

	TCTGAGTCCAGGCGCAGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGG AGGTGGCGGAAGCCAGCGGCCCGGCTGTGCCACAAGGGCCCCATGTGC TAAGAATTC (SEQ ID NO: 109)
Ej 15	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGG TGGCGGAAGCCAGCGGCCCGGCTGTGCCACAAGGGCCCCATGTGCTAA GAATTC (SEQ ID NO: 110)
Ej 16	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA

	GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTAGCCAGCGGCCCCGGCTGTGCCACAAGGGC CCCATGTGCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 111)
Ej 17	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCCAGCGGCCCCGGCTGTGCCACAAGGGC CCCATGTGCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 112)
Ej 18	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG

	GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAGGCAGCCAGCGGCCCCGGCTGTGC CACAAGGGCCCCATGTGCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 113)
Ej 19	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGATAAGACACACACTTGCCCCCCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAG CCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGG TCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACA GTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCT CTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAA GAGAACCCCAAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAA GAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGAC ATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTACAAGA CCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAG CTGACCGTGGATAAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTC TCTGAGTCCAGGCAAAGGTGGCGGAGGCAGCCAGCGGCCCCGGCTGTGC CACAAGGGCCCCATGTGCTAAGAATTC (SEQ ID NO: 114)
Ej 20	GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGT GGGTGCCTGGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCC TTGTCCAGCACCAGAGGCAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCA CCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACAT

	GCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAG GAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATA AGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCA GCCAAGAGAACCCCGAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATG ACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCT CCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAATTA CAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATT CTAAGCTGACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTC ATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCC CTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 115)
--	--

Ejemplo 9: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 5 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGAGGG
 251 GSGGGSGGGGSQRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 116)

en donde GSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y

10 QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el polipéptido.

Ejemplo 10: Fusión de Fc- apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 15 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG
 251 SGGGSGGGGSQRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 117)

en donde GSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y

20 QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el polipéptido.

Ejemplo 11: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 5 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSQ
 251 RPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 118)

en donde GS representa el enlazador y QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el
 10 polipéptido.

Ejemplo 12: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 15 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGQ
 251 RPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 119)

en donde GG representa el enlazador y QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el
 20 polipéptido.

Ejemplo 13: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 25 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
 251 GSQRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 120)

en donde GGGGS (SEQ ID NO: 13) representa el enlazador y

30 QRPRLC*HKGPMC*F (SEQ ID NO: 17) es el polipéptido.

Ejemplo 14: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 5 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
 251 GSGGGSGGGGSQRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 121)

en donde GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y
QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

10 **Ejemplo 15: Fusión de Fc- Apelina:**

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 15 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGAGGG
 251 GSGGGSGGGGSQRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 122)

en donde GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y
QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

20 **Ejemplo 16: Fusión de Fc- apelina:**

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 25 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG
 251 SGGGSGGGGSQRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 123)

en donde GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 11) representa el enlazador y
QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

30 **Ejemplo 17: Fusión de Fc- apelina:**

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGSQ
 251 RPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 124)

- 5 en donde GS representa el enlazador y QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

Ejemplo 18: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 10 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGQ
 251 RPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO:125)

- 15 en donde GG representa el enlazador y QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

Ejemplo 19: Fusión de Fc- Apelina:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 20 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
 251 GSQRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 126)

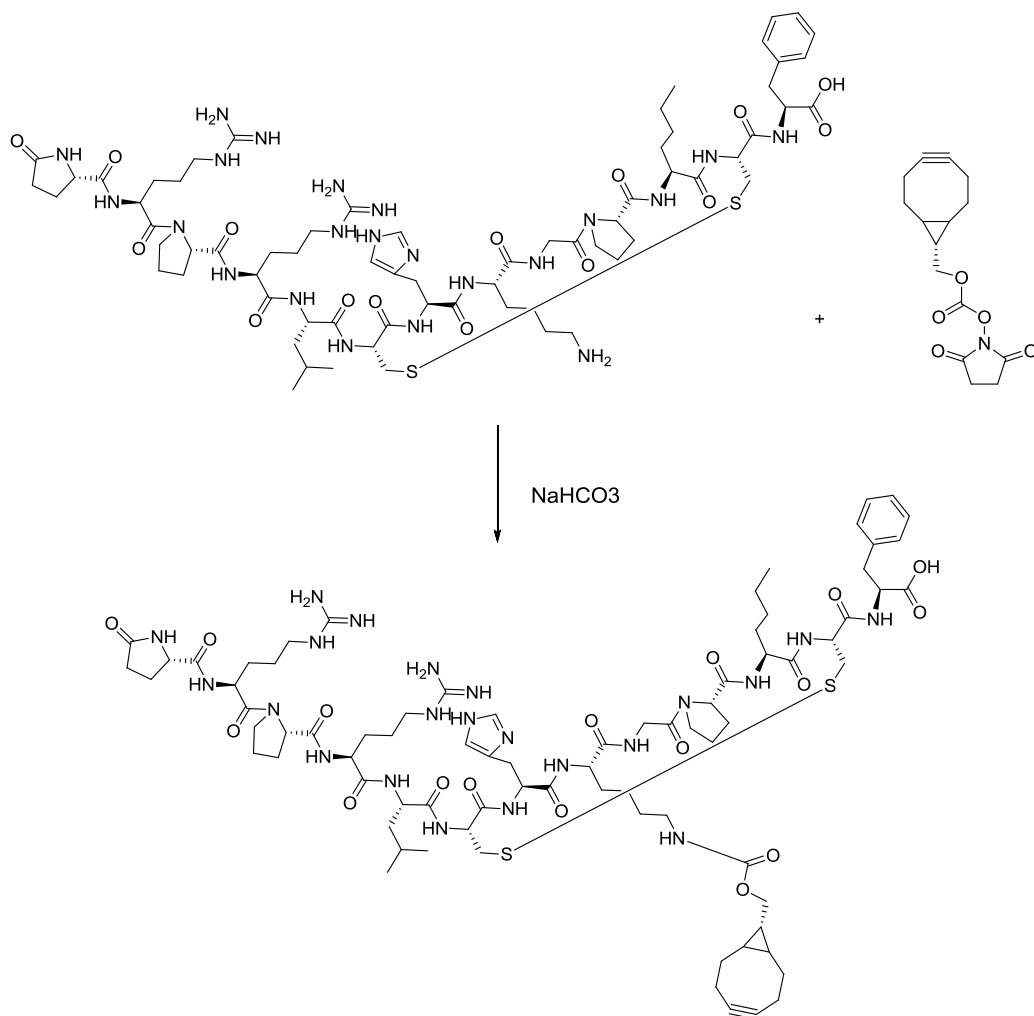
- 25 en donde GGGGS (SEQ ID NO: 13) representa el enlazador y QRPRLC*HKGPMC* (SEQ ID NO: 18) es el polipéptido.

Ejemplo 20: Péptido cíclico de apelina conjugado con un ácido graso a través de un enlazador BCN- PEG

30

Paso 1: Enlazador de péptido- BCN Apelina (BCN es ((1R,8S,9s)- Bíciclo[6.1.0]non-4 - in- 9- ilmetil N- carbonato)

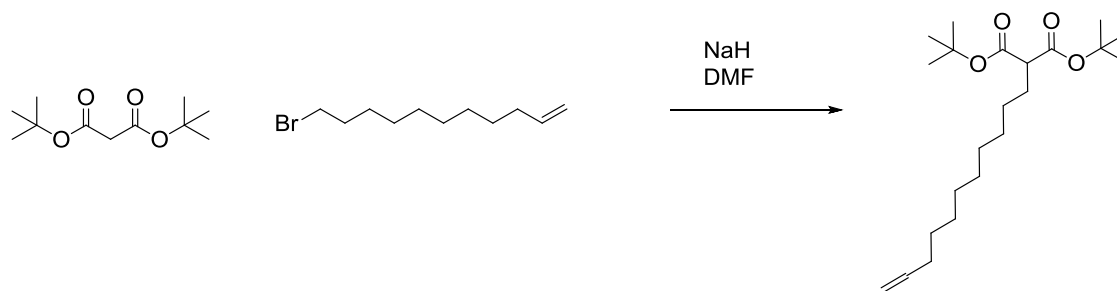
- 159 -



Una mezcla de pE- R- P- R- L- C*- H- K- G- P- Nle- C*- F- OH(C⁶- C¹² Disulfuro) (SEQ ID NO: 30) 50 mg, 0,033 mmoles, como se prepara en la patente estadounidense No. 8,673848), bicarbonato de sodio (18 mg, 0,215 mmol) y agua (40 μL) en DMF (0,5 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, 18 mg, 0,065 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Una mezcla de adiciones + 1 y + 2 se observó por LCMS, así que la mezcla se purificó por HPLC activada por masa (Método de Péptido 5 de ACN al 25- 50% gradiente de 5 min: Condiciones: columna Sunfire 30x50mm 5 μm ACN/H₂O w/ TFA al 0.1% 75ml/min 1.5ml de inyección): temperatura ambiente 3.2min (+1), temperatura ambiente 4.65 min, 4.9min (mezcla +1 y +2). LCMS confirmó el producto +1 deseado con rendimiento del 61% y mezcla de +1, +2 con rendimiento del 18%. LCMS: (Eluyente Básico A: Agua + Eluyente B

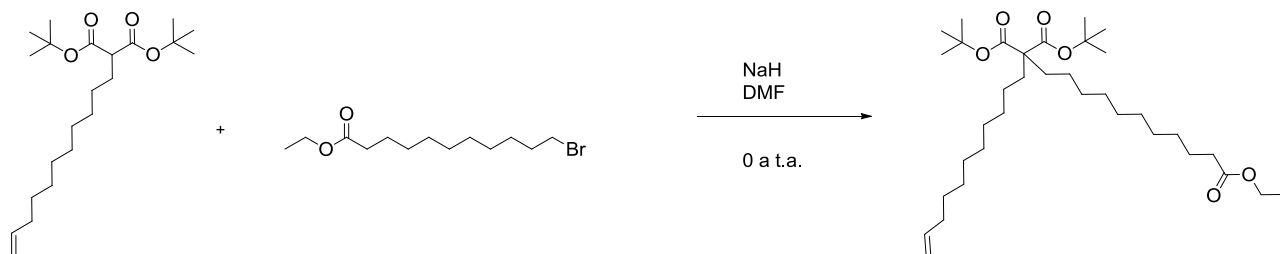
de Hidroxido de Amonio a 5mM: Columna Acídica de ACN: Sunfire C18 3.5µm 3.0x30mm - 40°C Columna Básica: XBridge C18 3.5µm 3.0x30mm - 40°C) Tiempo de retención: 0,98 min; MS [M +2]₂₊: observado: 856.0, calculado: 865,0245.

5 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 N₂ 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 H₂O (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.

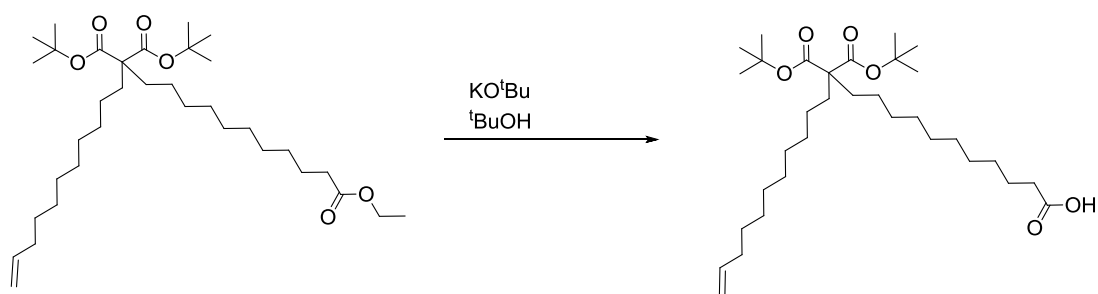
15 Paso 3: docos- 21- eno- 1,11,11- tricarboxilato de 1- etilo de 11,11- di- terc- butilo



20 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 aaggrea por goteo lentamente. La

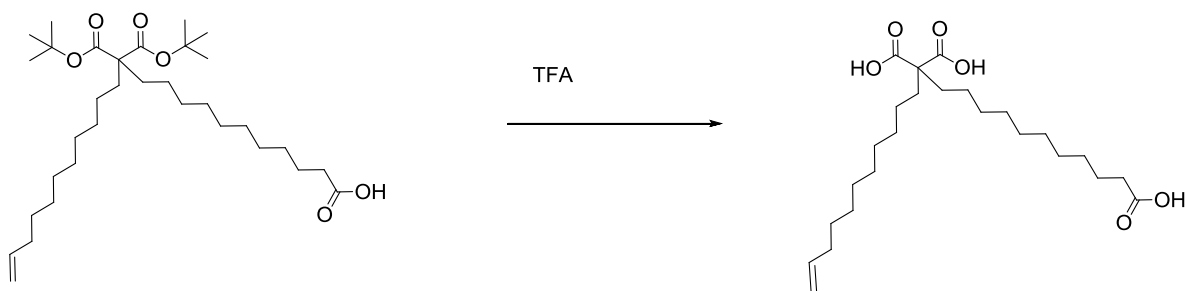
reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. La mezcla se diluye con EtOAc (40 ml) y se lava una vez con H₂O (25 ml). La capa acuosa se extrae una vez con EtOAc (40 ml) y las capas orgánicas se combinan, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se concentran. La muestra se disuelve 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- butoxycarbonil)tricos- 22- enóico



- 10 A una solución del compuesto de la etapa 3 (0,037 mmol) en ^tBuOH (1 ml) se añade una solución de KO^tBu (114 mg, 1,012 mmol) en ^tBuOH (2 ml) a 30 ° C en atmósfera de N₂. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se monitorea por TLC (1:1 EtOAc / hexanos, KMnO₄, 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 Na₂SO₄, se filtra, y se concentra. El material se llevó al siguiente
- 15 paso sin purificación adicional.

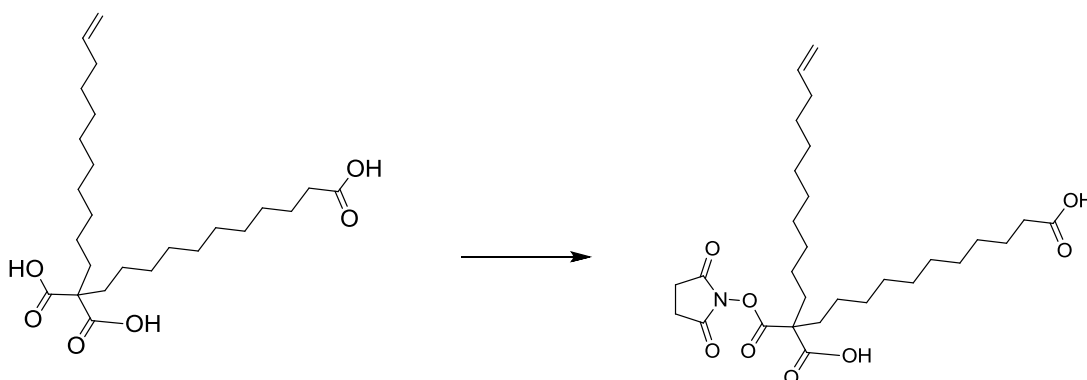
Paso 5: Ácido docos- 21- ene- 1,11,11- tricarboxílico



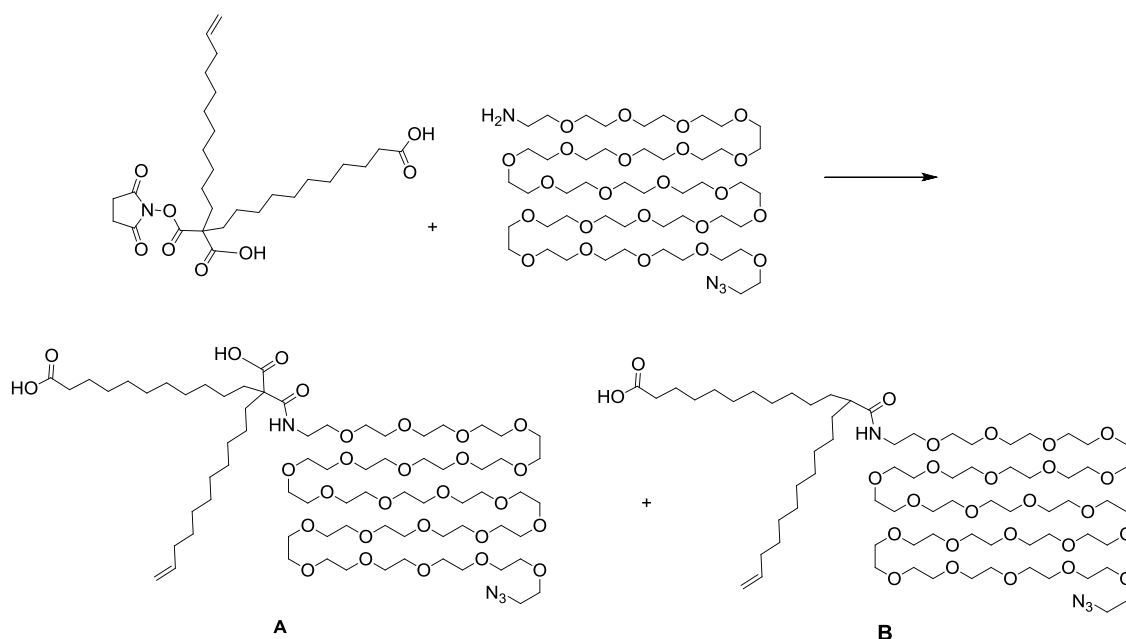
- 20 TFA (2 ml) se añade a un compuesto del paso 4 (0,022 mmol) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se diluye con DCM (10 ml) y se concentra.

El material se recoge en EtOAc (10 ml) y se lava con H₂O (20 ml). Las capas orgánicas se recolectan y se secan sobre Na₂SO₄, 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/H₂O W / TFA al 0,1% 75ml/min, inyección de 1,5 ml, ACN al 45-
5 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
(Intermedio 45: 400 mg, 0.908mmol) en DCM (7 ml) y THF (0,7 ml). La reacción se agitó
15 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 D Rt = 1.51min, M + H
538.3; ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO- d) □ 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,
20 7,34 Hz, 1 H) 3,78 (dd, J = 11,31, 5,20 Hz, 1 H) 3,99- 4,10 (m, 1 H).

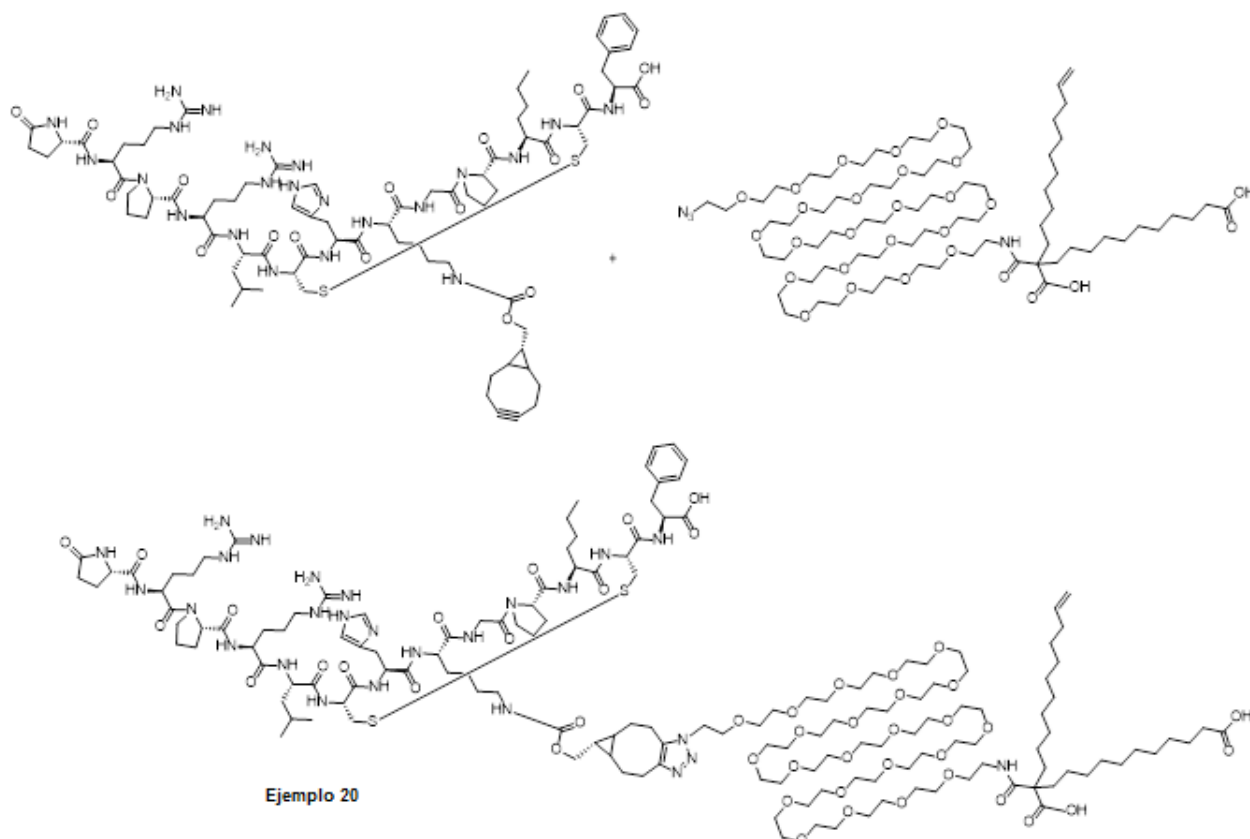
Paso 7: enlazador de PEG con ácido graso

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 (39 μ L, 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 Método D Rt = 1.35min, $[M + 2 H]_{+2}$ 761,9; 1H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO- d_3) 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 D Rt = 1.50min, $[M + 2 H]$ 2 739,9; 1H RMN (400 MHz, ACETONITRILLO- d_3) 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:

- 164 -

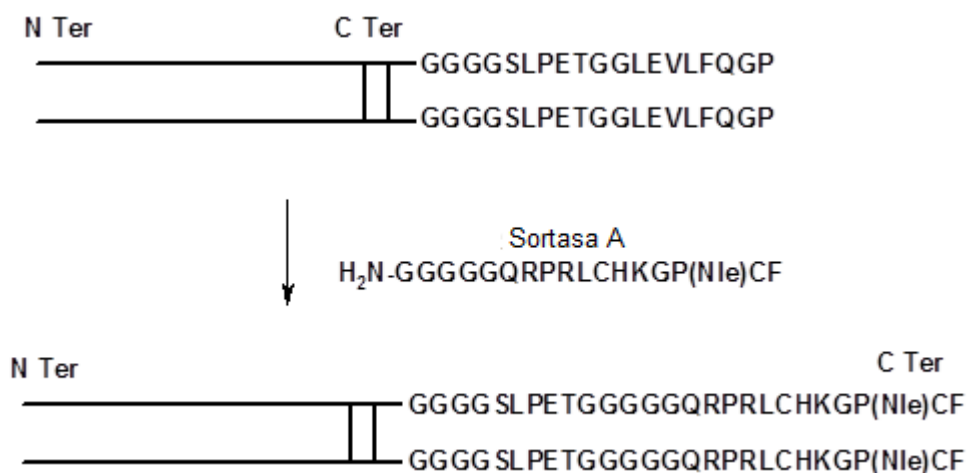


Una mezcla de *pE*- R- P- R- L- C*- H- N₆- [[(1 α ,8 α ,9 α)- biciclo[6.1.0]non- 4- in- 9- ilmetoxi]carbonil]- K- G- P- Nle- C*- F- OH(C⁶- C¹² Disulfuro) (SEQ ID NO: 127) (21,33 mg, 0,014 mmol) y compuesto del paso 7 (24 mg, 0,014 mmoles) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La reacción se completó por LCMS y se liofilizó para proporcionar el producto del título (23 mg, 48%). LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 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: 2,22 minutos; MS [M +2]₂₊: observado: 1616.9464, calculado: 1616,976.

Ejemplo 21: Conjugación de Fc a un péptido APJ usando sortasa y un motivo de reconocimiento de sortasa.

Esquema General (SEQ ID NOS 128, 128, 129, 130, y 130, respectivamente, en orden de aparición):

- 165 -



Paso 1: preparación de constructo de Fc- Sortasa:

Clonación de Constructo:

- 5 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: 131) 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
- 10 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

15 GGTGCCAGGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCT

GAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC

TGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA

GGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC

CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGT

20 GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT

GTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG

CCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGAC

CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC

GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCC

CCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACA
 AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGGCG
 GAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCCTAAGA
 5 ATTC (SEQ ID NO: 132)

Secuencia del constructo de Fc Sortasa:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 10 151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
 251 *GSLPETGGLEVLFGGP* (SEQ ID NO: 133)

en el que *GGGGS* (SEQ ID NO: 13) representa el enlazador y *LPETGGLEVLFGGP*
 (SEQ ID NO: 134) el motivo de reconocimiento de sortasa (nota: *GGLEVLFGGP* (SEQ ID
 15 NO: 15) *es cortado durante el tratamiento con sortasa*).

Expresión y Purificación de Proteínas:

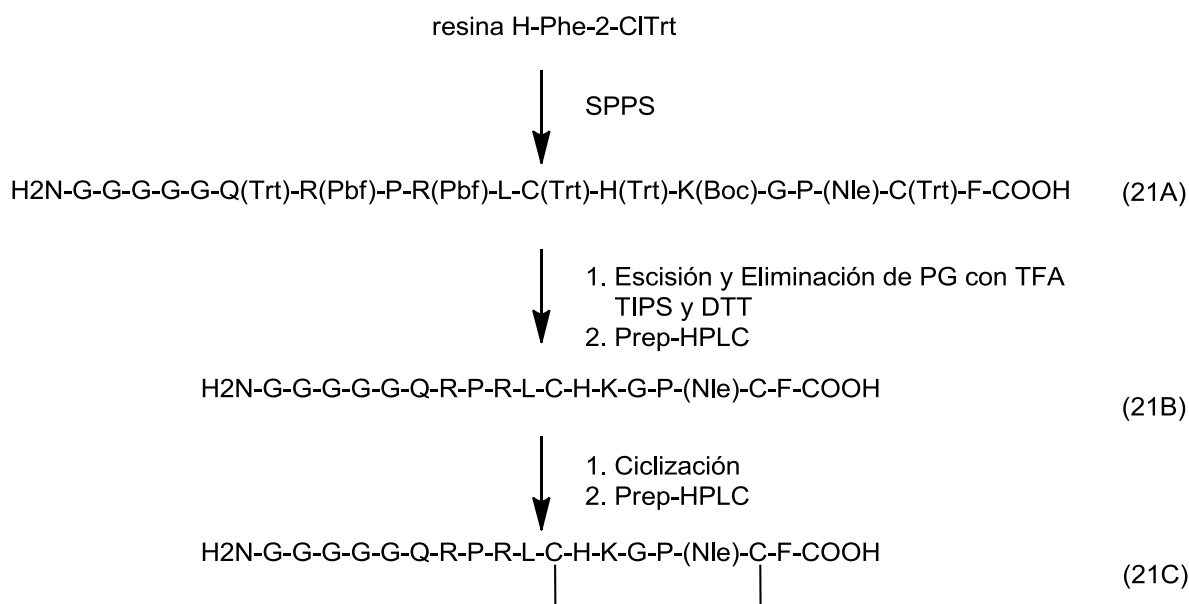
ADN plásmido de expresión de Fc- sortasa se transfectó en células HEK293T a una
 densidad de 1×10^6 células por ml utilizando métodos estándar de polietilenimina. Se hizo
 20 crecer 500 ml de cultivos en FreeStyle 293 Medium (Life Technologies) en matraz de 3 L
 durante 4 días a 37 ° C.

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
 25 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.

30 **Control de Calidad de Proteínas de Fc- Sortasa:**

5 **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.

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



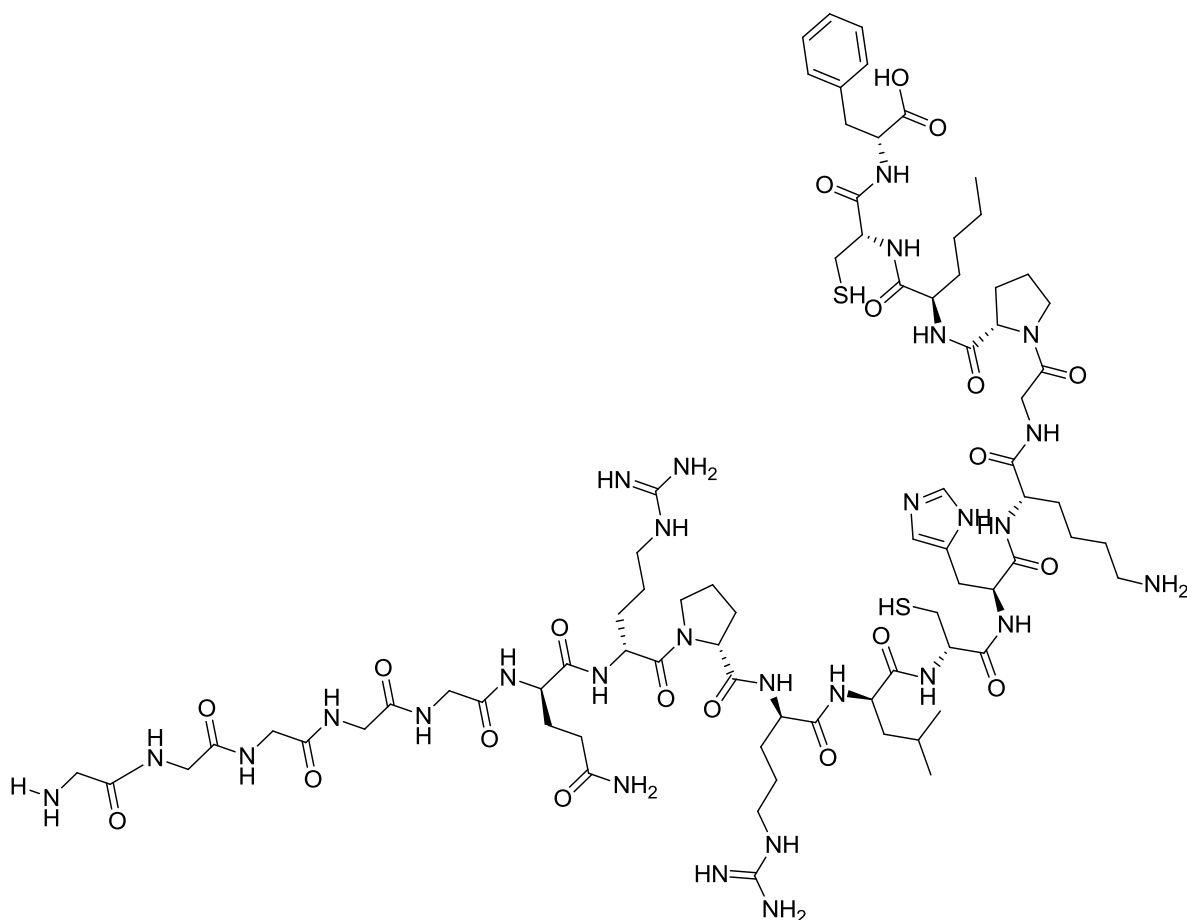
Dos lotes de resina de H- Phe- 2- ClTrt (Novabiochem, 0,342 g, 0,25 mmoles, 0,73 mmol/ g) se sometió a la síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (CEM LIBERTY) con Arg doble estándar para residuos de Arg. Los aminoácidos se prepararon como soluciones 0,2 M en DMF.

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- L- Cys(Trt)- OH	1x 6 min	2 min a 25 °C 4 min a 50 °C
2	Fmoc- L- Nle- OH	1 x 5 min	75 ° C
3	Fmoc- L- Pro- OH	1 x 5 min	75 ° C
4	Fmoc- L- Gly- OH	1 x 5 min	75 ° C
5	Fmoc- Lys(Boc)- OH	1 x 5 min	75 ° C
6	Fmoc- L- His(Trt)- OH	1 x 5 min	75 ° C
7	Fmoc- L- Cys(Trt)- OH	1 x 6 min	2 min a 25 °C 4 min a 50 °C
8	Fmoc- L- Leu- OH	1 x 5 min	75 ° C
9	Fmoc- L- Arg(Pbf)- OH	2 x 30 min	25 min a 25 °C 5 min a 75 °C
10	Fmoc- L- Pro- OH	1 x 5 min	75 ° C
11	Fmoc- L- Arg(Pbf)- OH	2 x 30 min	25 min a 25 °C 5 min a 75 °C
12	Fmoc- L- Cys(Trt)- OH	1 x 5 min	75 ° C
13	Fmoc- Gly- Gly- Gly- OH	1 x 5 min	75 ° C
14	Fmoc- Gly- OH	1 x 5 min	75 ° C
15	Fmoc- Gly- OH	1 x 5 min	75 ° C

5 Paso 2b: Preparación de Intermedio **21B**, H₂N- GGGGGQRPR~~L~~CHKGP(Nle)CF-
COOH (SEQ ID NO: 129)



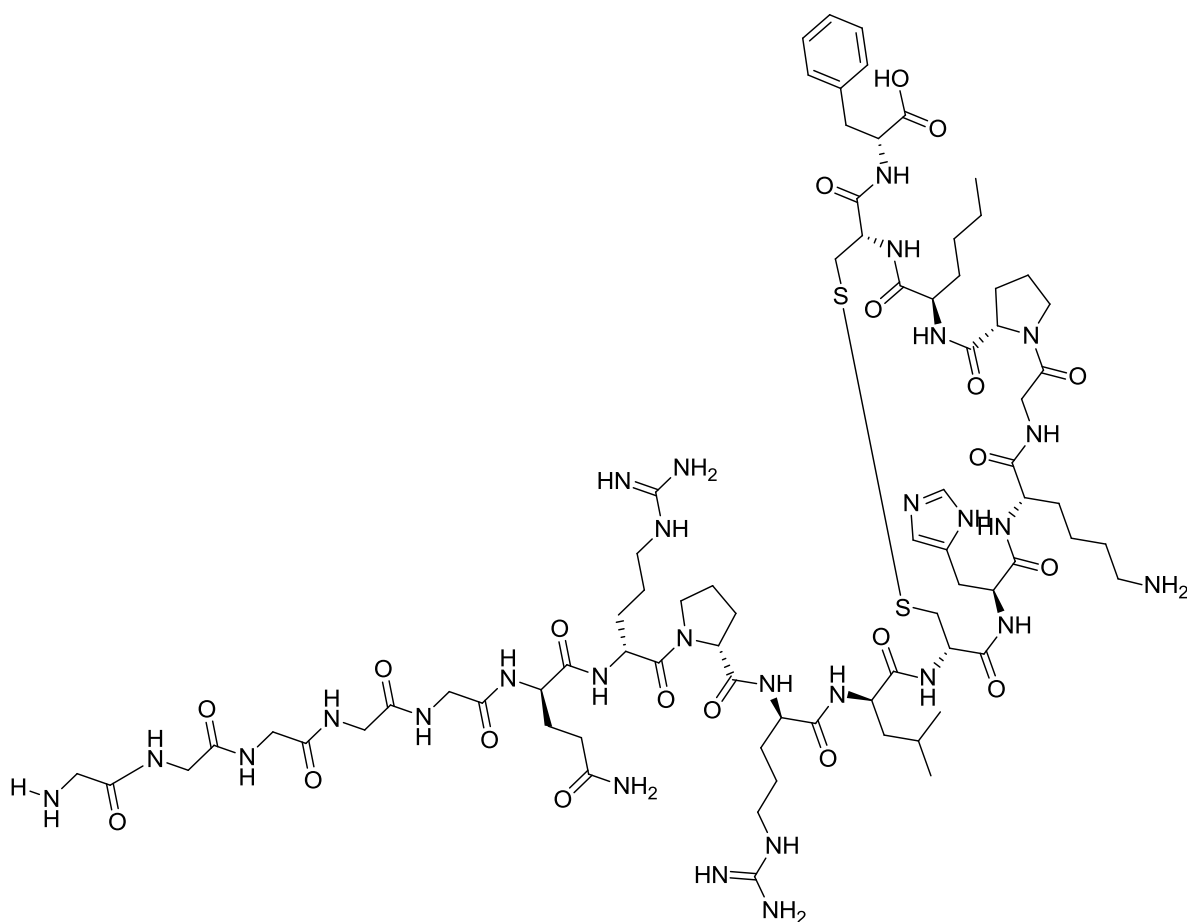
Al **intermedio 21A** (1,454 g, 0,5 mmol) se añadió 6 ml de solución de TFA al 95%/H₂O/
al 2.5%TIPS al 2.5% y DTT (1,452 g, 10,00 mmol), la mezcla resultante se sacudió a
temperatura ambiente durante 3 horas, luego se filtró. El filtrado se dejó caer en 80 ml de éter
frío, después se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. El disolvente se eliminó y el sólido
blanco se lavó con éter (3 x 80 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™ Prep C18 OBD™ 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 **intermedio 21B** como sal de TFA (213 mg, 23%).

Paso 3: Preparación de H₂N- GGGGGQRPRLC*HKGP(Nle)C*F- COOH (C¹¹- C¹⁷ disulfuro) (SEQ ID NO: 129), **intermedio 21C**

10



A **intermedio 21B** (213 mg, 0,166 mmol) en 3,85 ml de H₂O se añadió I₂ (50 mM en 15 AcOH, 4,63 ml 0,232 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/H₂O = 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™ Prep C18 OBD™ 30x50mm 5 um de ACN/H₂O W /TFA al 0,1% 75ml/min, ACN al 7,5- 20% 8 min de gradiente). La fracción de producto se liofilizó para proporcionar H₂N-GGGGGQRPRLC*HKGP(Nle)C*F- COOH (C¹¹- C¹⁷ disulfuro) (SEQ ID NO: 129), **intermedio 21C** como sal de TFA (65 mg, 31%). 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: 0,79 minutos; MS [M +2]₂₊: observado: 919,9562.

Paso 3: Conjugación de sortasa de Fc- Sortasa e intermedio 21C

15 1) Conjugación de Sortasa Quimioenzimática

En baño de hielo, a la Fc- LPETGG (SEQ ID NO: 136) (1397 µl, 0,081 µmol) en solución de búfer de PBS (pH 7,4) se añadió la solución de H₂N-GGGGGQRPRLC*HKGP(Nle)C*F- COOH(C¹¹- C¹⁷ disulfuro) (SEQ ID NO: 129) (148 µl, 4,04 µmol, 50 mg / ml) en búfer de Tris- 8.0, seguido de 520 µM de sortasa A* (155 µl, 0,081 µmol) en 50 mM de Tris- Cl, pH 7,4, NaCl a 150 mM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. LC / MS mostró la reacción completada.

(Sortasa A*): Secuencia del mutante A de Sortasa:

MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATREQLNRGVSF~~AKEN~~QSLD
DQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRNVKPTA~~VE~~V
25 LDEQKGKDKQLTLITCDDYNEETGVWETRKIFVATEVKLEHHHHHHH (SEQ ID NO:
137)

donde las letras en negrilla representan los aminoácidos que fueron mutados y las letras subrayadas representan aminoácidos descritos (Chen et al., PNAS, Vol. 108, n ° 28, 2011, 11.399- 11.403) que no están conservados en la secuencia original de S aureus sortasa A (Mazmanian et al. Science (Washington, D. C.) (1999), 285(5428), 760- 763)

El mutante de sortasa A mutante se expresó en E. coli y se purificó por cromatografía de afinidad que explora la etiqueta de polihistidina que comprende en su extremo C, siguiendo

los protocolos establecidos (Carla P. Guimaraes et al.: "Etiquetado de extremo C y bucle interno de sitio específico de proteínas utilizando reacciones mediadas por sortasa", protocolos Nature, Vol. 8, n ° 9, 2013, 1787- 1799).

2) Purificación y desalinización

5 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 21 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
10 proporcionar 2 ml de solución objetivo, la concentración media fue de 1,62 mg / ml, y la recuperación fue de 68%. 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] 59346.5000.

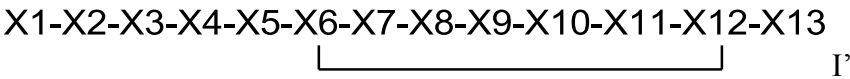
15 Se ha encontrado que los bioconjugados en los ejemplos a anteriores tienen valores EC_{50} en el rango de 0.01 nM a 1100 nM aproximadamente para potencia del receptor APJ. Se ha encontrado que el bioconjugado en los ejemplos anteriores tienen una estabilidad de plasma mayor de 2 minutos, mayor de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

20 Se puede ver que los bioconjugados 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.

25 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.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Examen de Forma)

1. Un bioconjugado o un multímero del mismo que comprende:
a. Un péptido o polipéptido que tiene la siguiente fórmula I' (SEQ ID NO: 1):



en donde:

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

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

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

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

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

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado de C, c, hC, D-hC, K, D, Orn, Dab o E en el que la cadena lateral de X6 y X12 están unidas entre sí a través de un enlace covalente formando ya sea un monosulfuro (-S-), un disulfuro (-S-S-) o un enlace amida (-NHC(O)-o -C(O)-NH-); o, alternativamente X6 es K, X13 está ausente y X12 es F o f en donde el extremo C-terminal de X12 forma un enlace de amida con la cadena lateral amino de X6;

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

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

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

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

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

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

en donde:

Nle es L-norleucina;

D-hC es D-homocisteína

hC es L-homocisteína;

hF es L-homofenilalanina;

hK es L-lisina;

Nal es L-nafatalina;

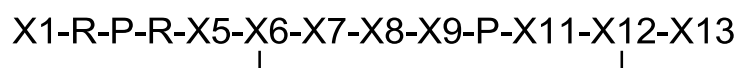
Orn es ornitina;
Aib es ácido α -aminoisobutírico;
Dab es ácido (S)-diaminobutírico;
Dap es ácido (S)-2,3-diaminopropiónico;
M(O) es metionina sulfona;
Cha es (S)- β -ciclohexilalanina;
4-amino-lsn es ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico;
lsn es isonipecotinoilo;
pE es ácido L-pirolutámico;
3-PyA es 3-(3-piridil)-L-alanina;
4-PhF es 4-Fenil-L-fenilalanina;

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

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

b. una fracción de extensión de vida media; y en donde dicho péptido o polipéptido y fracción de extensión de vida media están covalentemente unidos o fusionados opcionalmente a través de un enlazador.

2. Un bioconjugado o un multímero del mismo, de acuerdo con la Reivindicación 1 en donde el polipéptido tiene la siguiente fórmula (SEQ ID NO: 139):



II

X1 está ausente, pE, R, Q o lsn;

X5 es L o Cha;

X7 es H, Aib, F, K

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

X9 es G o Aib;

X11 es Nle o Cha;

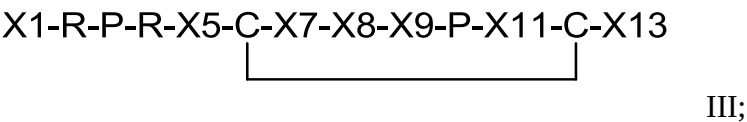
X13 es ausente o es F, f, K;

X6 y X12 son independientemente un aminoácido natural o no natural seleccionado a partir de C, c, hC, D-hc, K, D, Orn, Dab o E en donde la cadena lateral de X6 y X12 están enlazadas juntas a través de un enlace covalente que forma un disulfuro o un enlace de amida; y en donde el extremo N y el extremo C opcionalmente forman un anillo junto con 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de glicina; o una amida, un éster o una sal del polipéptido; o un polipéptido sustancialmente equivalente al mismo.

3. El bioconjugado o un multímero del mismo, según la Reivindicación 1 o 2, en donde:

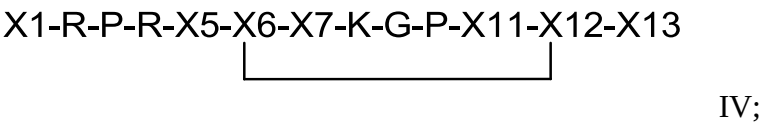
X6 y X12 se seleccionan independientemente de K, Orn, Dab, E y D y en donde la cadena lateral de X6 y X12 forman juntas un enlace de amida.

4. El bioconjugado o un multímero del mismo, según la Reivindicación 1 o 2, en donde: X6 y X12 son independientemente C, c, D-hC o hC en donde la cadena lateral de X6 y X12 forman juntas un enlace de disulfuro.
5. El bioconjugado o un multímero del mismo, según la Reivindicación 1, 2, o 4 en donde el polipéptido tiene la fórmula III (SEQ ID NO: 4):



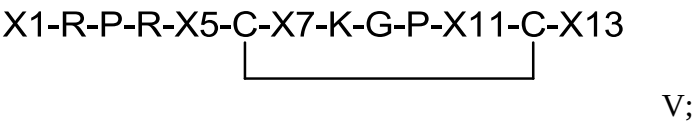
o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

6. El bioconjugado o un multímero del mismo, según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido tiene la fórmula IV (SEQ ID NO:5):



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

7. El bioconjugado o un multímero del mismo, según cualquiera de las Reivindicaciones 1, 2, y 4 a 6 en donde el polipéptido tiene la fórmula V (SEQ ID NO:6):



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

8. El bioconjugado o un multímero del mismo, de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el polipéptido se selecciona a partir de:

pE-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-D*-Fenetilamina*, (SEQ ID NO: 23),
pE-R-P-R-L-K-H-F-G-P-Nle-E*-Fenetilamina*, (SEQ ID NO: 24),
pE-R-P-R-L-Orn-H-F-G-P-Nle-D*-Fenetilamina*, (SEQ ID NO: 25),
pE-R-P-R-L-Dab-H-F-G-P-Nle-D*-Fenetilamina*, (SEQ ID NO: 26),
pE-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-F**, (SEQ ID NO: 27),
pE-R-P-R-L-K-F-K-G-P-Nle-f**, (SEQ ID NO: 28),
Q-R-P-R-L-C*-F-K-G-P-Nle-C*-F-G-G, (SEQ ID NO: 29),
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 30),
pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 31),
pE-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH*, (SEQ ID NO: 32),
H-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH*, (SEQ ID NO: 33),
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-Fenetilamina*, (SEQ ID NO: 34),
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-f-OH*, (SEQ ID NO: 35),

pE-R-P-R-Cha-C-H-K-G-P-Cha-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 36),
pE-R-P-R-L-C-F-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 37),
H-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 38),
H-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 39),
H-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 40),
pE-R-P-R-L-C-H-F-G-P-Nle-C*-fenetilamina*, (SEQ ID NO: 41),
pE-R-P-R-L-C-H-K-Aib-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 42),
pE-R-P-R-L-C-H-(4-NH-Isn)-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 43),
*pE-R-P-C**-L-C*-C**-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 44),
*pE-R-C**-R-L-C*-C**-K-G-P-Nle-C*-F-OH*; (SEQ ID NO: 45);
pE-r-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 46);
pE-F-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 47);
pE-E-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 48);
pE-R-p-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 49);
pE-R-K-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 50);
pE-R-D-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 51);
pE-R-P-F-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 52);
pE-R-P-R-K-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 53);
pE-R-P-R-L-C-H-E-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 54);
pE-R-P-R-L-C-H-K-D-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 55);
pE-R-P-E-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 56);
pE-R-P-R-(4-PhF)-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 57);
pE-R-P-R-D-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 58);
pE-R-P-R-L-C-E-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 59);
pE-R-P-R-L-C-H-K-L-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 60);
pE-R-P-R-L-C-H-K-R-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 61);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-(ácido pipercolico)-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 62);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-(3-PyA)-C-F-OH* (SEQ ID NO: 63);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-H-OH* (SEQ ID NO: 64);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-E-OH* (SEQ ID NO: 65);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-NH₂* (SEQ ID NO: 75);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-NH₂* (SEQ ID NO: 74);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-OH* (SEQ ID NO: 66);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-hC*-F-OH* (SEQ ID NO: 67);
pE-R-P-R-L-hC-H-K-G-P-Nle-hC*-F-OH* (SEQ ID NO: 68);
pE-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 69);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-(D-hC)*-F-OH* (SEQ ID NO: 70);
pE-R-P-R-L-(D-hC)-H-K-G-P-Nle-(D-hC)*-F-OH* (SEQ ID NO: 71);
pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-c*-F-OH* (SEQ ID NO: 72);
pE-R-P-R-L-c-H-K-G-P-Nle-c*-F-OH* (SEQ ID NO: 73);
*pE-R-P-R-L-C****-H-K-G-P-Nle-C****-F-OH* (SEQ ID NO: 76);

Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 138), y

Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-M-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 17);

en donde los dos aminoácidos etiquetados con “*” representan los aminoácidos que forman un enlace de disulfuro o amida a través de cadena lateral o extremo, respectivamente y en donde los dos aminoácidos etiquetados con “**” representan los aminoácidos que forman un disulfuro a través de su cadena lateral o enlace de amida a través de sus extremos; y en donde los 2 aminoácidos etiquetados con “***” representan los aminoácidos que forman un enlace de monosulfuro a través de su cadena lateral; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

9. Un bionconjugado de acuerdo con la Reivindicación 1 en donde el polipéptido se selecciona de:

Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 138),

Q-R-P-R-L-C-H-K-G-P-M-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 17),

H-Isn-R-P-R-L-C-Aib-K-G-P-Nle-C*-f-OH* (SEQ ID NO: 33),

H-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 38),

H-R-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*, (SEQ ID NO: 39), y

H-Isn-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH* (SEQ ID NO: 40);

en donde las cadenas laterales de los 2 aminoácidos de cisteína C* forman juntas un enlace de disulfuro; o una amida, un éster o una sal del polipéptido.

10. El bioconjugado o un mutímero del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 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.

11. El bioconjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la fracción de extensión de vida media es un fragmento Fc modificado por FcLALA con una mutación LALA (L234A, L235A).

12. El bioconjugado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1, 4-7, 10 y 11 en donde la fracción de extensión de vida media es un dominio Fc que se fusiona a un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Fórmulas I y III a IX a través de un enlazador y en donde el enlazador tiene la siguiente fórmula:

[GGGS] *n*, *n* es 1, 2 o 3 (SEQ ID NO: 16) o el enlazador es GG o GS y el polipéptido según cualquiera de las fórmulas I, y III-IX contiene aminoácidos de origen natural.

13. El bioconjugado según la Reivindicación 12 en donde la fracción de extensión de vida media es una variante Fc en donde la lisina C-terminal ha sido eliminada o sustituida por alanina.

14. El bioconjugado de acuerdo con la Reivindicación 12 o 13 en donde el polipéptido es un polipéptido de la Fórmula I en donde:

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

X2 es R, A, K, H, F o E;

X3 es P, A, K o D;

X4 es R, A, F o E;

X5 es L, A, K, D o F;

X6 y X12 son C y están unidos juntos a través de un enlace de disulfuro (-S-S-);

X7 es H, A, K, F, P, N o E

X8 es K, F, A o E;

X9 es G, A, D, L o R;

X10 es P o A;

X11 es M, A, F, Y, L o K; y

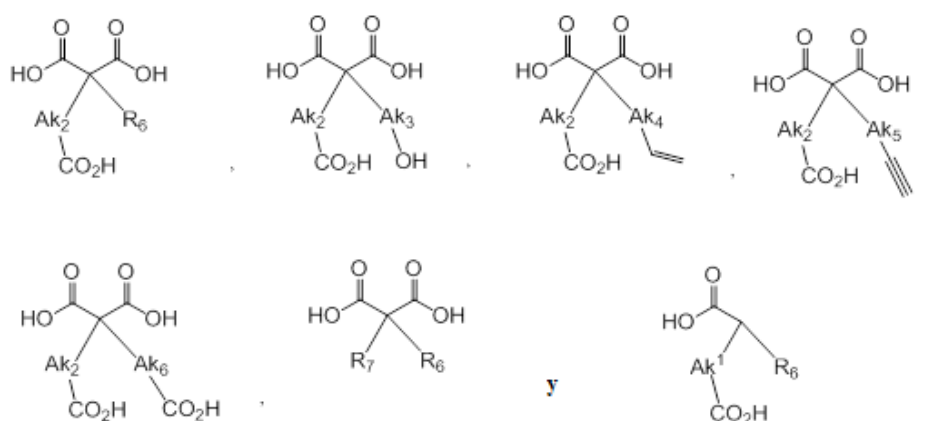
X13 es el extremo C y está ausente o se selecciona a partir de F, I, A, K, H y E.

15. El bioconjugado según la Reivindicación 11, 12, 13 o 14 en donde el polipéptido es: Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-M-C*-F (SEQ ID NO: 17).

16. El bioconjugado o multímero del mismo según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10 en donde la fracción de extensión de vida media es albúmina de suero humano.

17. El bioconjugado según cualquiera de las Reivindicaciones 1-15 en donde la fracción de extensión de vida media es un ácido graso.

18. El bioconjugado según la Reivindicación 17 en donde el ácido graso se selecciona de:



en donde Ak², Ak³, Ak⁴, Ak⁵ y Ak⁶ son independientemente un (C₈₋₂₀)alquileo, R⁶ y R⁷ son independientemente alquilo(C₈₋₂₀).

19. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un bioconjugado según cualquiera de las Reivindicaciones 1-18 o un multímero del mismo, y uno o más co-agentes terapéuticamente activos.

20. Una combinación según la Reivindicación 19 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 convertidora 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.

21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un bioconjugado según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 18 o un múltiplo del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.
