

DERIVADOS ESTABILIZADOS DE ADRENOMEDULINA Y USO DE LOS MISMOS

La presente invención se refiere a derivados peptídicos de Adrenomedulina (ADM) estabilizados, biológicamente activos, novedosos. Los compuestos de la invención son estabilizados mediante la sustitución del enlace disulfuro intramolecular y opcionalmente mediante una o más modificaciones adicionales seleccionadas entre el reemplazo de aminoácidos por aminoácidos naturales o no naturales, ligando covalentemente el derivado peptídico a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en un polímero, un Fc, un ligando de unión a FcRn, albúmina y un ligando de unión a albúmina, y N-metilación de por lo menos un enlace amida. La invención se refiere además a los compuestos para utilizar en un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios, y a medicamentos que comprenden los compuestos para el tratamiento y/o prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

La adrenomedulina (ADM), hormona peptídica de 52 aminoácidos es producida en la glándula adrenal, pulmón, riñón, musculatura cardíaca y en otros órganos. Los niveles plasmáticos de ADM están en el rango picomolar más bajo. La ADM es un miembro de la familia de péptidos relacionados con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés) y como tal se une a un receptor acoplado a la proteína G heterodimérico que consiste en CRLR y RAMP 2 o 3 (*Calcitonin-receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 2 or 3* (*Receptor del tipo receptor de calcitonina y proteína modificadora de la actividad del receptor 2 o 3*)). La activación del receptor de ADM conduce a la elevación

intracelular de monofosfato de adenosina 3', 5'-cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) en las células que portan receptores. Los receptores de ADM están presentes en diferentes tipos celulares en casi todos los órganos incluyendo en las células endoteliales. Se cree que la ADM es metabolizada por endopeptidasa neutra y es predominantemente evacuada en el pulmón donde los receptores de ADM son altamente expresados [para una revisión véase Gibbons C, Dackor R, Dunworth W, Fritz-Six K, Caron KM, *Mol Endocrinol* **21**(4), 783–796 (2007)].

Los datos experimentales de la bibliografía técnica sugieren que la ADM está involucrada en diversos roles funcionales que incluyen, entre otros, la regulación de la presión sanguínea, broncodilatación, función renal, secreción hormonal, crecimiento celular, diferenciación, neurotransmisión, y modulación de la respuesta inmune. Adicionalmente, la ADM cumple un rol fundamental como factor autocrino durante la proliferación y regeneración de células endoteliales [para una revisión véase García M.A., Martín-Santamaría S., de Pascual-Teresa B., Ramos A., Julián M., Martínez A., *Expert Opin Ther Targets*, **10**(2), 303–317 (2006)].

Existe un amplio acervo de datos de la bibliografía técnica los cuales demuestran que la ADM es indispensable para una función de barrera endotelial intacta y que la administración de ADM en niveles supra-fisiológicos ejerce funciones fuertes antiedematosas y antiinflamatorias en diversas afecciones inflamatorias en experimentos con animales incluyendo sepsis, lesión pulmonar aguda e inflamación intestinal [para una revisión véase Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke A., Suttorp N, Hippenstiel S, *Thromb Haemost*; **98**, 944–951 (2007)].

Hasta ahora, los ensayos clínicos de ADM se han llevado a cabo en indicaciones cardiovasculares con un criterio de valoración hemodinámico

medible tal como hipertensión pulmonar, hipertensión, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio agudo. La ADM mostró efectos hemodinámicos en diversos estudios en pacientes que sufren de las afecciones antes mencionadas. Sin embargo, los efectos eran solamente de corta duración y luego cesaban de inmediato al finalizar la administración. Estos hallazgos concordaban bien con el perfil farmacocinético conocido de ADM. Los efectos farmacodinámicos comprendían, entre otros, la reducción de la presión sanguínea arterial sistémica y pulmonar y aumento del gasto cardíaco [Troughton RW, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, *Hypertension*, **36**(4), 588–93 (2000); Nagaya N, Kangawa K, *Peptides*, **25**(11), 2013–8 (2004); Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, Nagaya N, Noguchi T, Yamada N, Morii I., Kawamura A, Doi K, Miyatake K, Tomoike H, Kangawa K, *J Cardiovasc Pharmacol*, **56**(4), 413–9 (2010)].

Resumidamente, en base a la evidencia a partir de una gran cantidad de datos experimentales en animales y primeros ensayos clínicos en el hombre, puede considerarse la elevación de ADM a niveles suprafisiológicos como un mecanismo objetivo para el tratamiento de diversas afecciones en el hombre y en los animales. Sin embargo, las principales limitaciones del uso de ADM como agente terapéutico son la aplicabilidad inconveniente de la terapia de infusión continua lo cual excluye su utilización para la mayoría de las potenciales indicaciones y los márgenes de seguridad potencialmente limitados con respecto a la hipotensión la cual puede ser el resultado de las administraciones mediante bolo de ADM.

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar derivados peptídicos de ADM estabilizados, biológicamente activos, novedosos los cuales se pueden emplear para el tratamiento de enfermedades, en particular de

trastornos cardiovasculares, edematosos e inflamatorios.

Muchos péptidos o proteínas terapéuticamente activos sufren de elevada depuración *in vivo*. Existen diversos métodos para aumentar la estabilidad de péptidos o proteínas terapéuticamente activos y reducir su depuración, incluyendo la alteración de enlaces disulfuro, N-metilación de enlaces amida, y conjugación con restos heterólogos tales como polímeros y proteínas.

Los agentes terapéuticos peptídicos que contienen enlaces disulfuro pueden ser problemáticos en su aplicación *in vivo*. Los puentes disulfuro son inestables hacia agentes reductores e isomerasas de disulfuro. La reducción del enlace disulfuro da como resultado un reordenamiento estructural y una pérdida de actividad. La proteína-disulfuro isomerasa (PDI) es una enzima del retículo endoplasmático. Las vías de plegamiento proteico contienen intermediarios con puentes disulfuro no nativos. La función esencial de PDI consiste en reordenar estos intermediarios para alcanzar la conformación final [Laboissiere MC, Sturley SL, Raines RT, The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds, *J Biol Chem.*, **270**(47), 28006–28009, **1995**]. Glutathione (GSH) reacciona con somatostatina para formar disulfuros mixtos, la reacción adicional con una segunda molécula de GSH conduce a la forma ditiol reducida de somatostatina y GSSG. El intercambio de tiol/ disulfuro se produce fácilmente; sin embargo, los disulfuros mixtos formados sufren rápidamente la reformación de los enlaces disulfuro intramoleculares [Rabenstein DL, Weaver KH, Kinetics and equilibria of the thiol/disulfide exchange reactions of somatostatin with glutathione, *J Org Chem.*, **61**(21), 7391–7397, **1996**]. El rol de los enlaces disulfuro en la estabilidad estructural de los

péptidos es descrito en Gehrmann J, Alewood PF, Craik DJ, Structure determination of the three disulfide bond isomers of α -conotoxin GI: a model for the role of disulfide bonds in structural stability, *J Mol Biol.*, **278**(2), 401–415, **1998**.

Las cistationas son resistentes a la reducción de tioles. Por lo tanto, las sustituciones de disulfuros con tioéteres son interesantes en el descubrimiento de fármacos, ya que proporcionan protección contra la reducción mientras que la estructura es solamente alterada mínimamente. Se sintetizaron análogos de tioéter del péptido inhibidor del complemento compstatina. Se retuvo en gran medida el potencial inhibidor, mientras que se mejoró la estabilidad frente a la reducción [Knerr PJ, Tzekou A, Ricklin D, Qu H, Chen H, van der Donk WA, Lambris JD, Synthesis and activity of thioether-containing analogues of the complement inhibitor compstatin, *ACS Chem Biol.*, **6**(7), 753–760, **2011**]. Miméticos de enlaces disulfuro peptídicos basados en diaminodiácidos se describen, por ej., en Cui HK, Guo Y, He Y, Wang FL, Chang HN, Wang YJ, Wu FM, Tian CL, Liu L, Diaminodiacid-based solid-phase synthesis of peptide disulfide bond mimics, *Angew Chem*, **125**, 9737–9741, **2013**. Se aplicaron tioéter y biscarda diaminodiácidos en la síntesis de miméticos de enlaces disulfuro peptídicos de análogos de taquiplesina I. Los derivados exhibieron una disminución de la actividad antimicrobiana, aunque una estabilidad sérica mejorada.

Kowalczyk R, Harris PW, Brimble MA, Callon KE, Watson M, Cornish J, Synthesis and evaluation of disulfide bond mimetics of amylin-(1–8) as agents to treat osteoporosis, *Bioorg Med Chem.*, **20**(8), 2661–2668, **2012**, se refieren al octapéptido amilina. El péptido nativo (1–8) es estable durante 6 meses

solamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de argón. Se sintetizaron análogos del péptido, donde se modificó el puente disulfuro ya sea mediante la inserción de ligantes o puentes de naturaleza diferente. Todos los análogos eran estables en la mesa de trabajo y, por lo tanto, exhibieron una estabilidad mejorada.

Muttenthaler M, Andersson A, de Araujo AD, Dekan Z, Lewis RJ, Alewood PF, Modulating oxytocin activity and plasma stability by disulfide bond engineering, *J Med Chem.*, **53**(24), 8585–8596, **2010**, se refiere a la síntesis de análogos de oxitocina con reemplazos de enlaces disulfuro (puentes tioéter, selenosulfuro, diselenido y ditelururo) a fin de mejorar la vida media metabólica de péptidos que contienen cisteína. En comparación con la oxitocina, algunos análogos retuvieron la afinidad y la potencia funcional y todos los miméticos exhibieron un aumento (1,5 – 3 veces) en la estabilidad plasmática.

Pakkala M, Weisell J, Hekim C, Vepsäläinen J, Wallen EA, Stenman UH, Koistinen H, Närvänen A, Mimetics of the disulfide bridge between the N- and C-terminal cysteines of the KLK3-stimulating peptide B-2, *Amino Acids.*, **39**(1), 233–242, **2010**, se refiere a peptidasa 3 relacionada con calicreína (KLK3). La actividad proteolítica de la peptidasa 3 relacionada con calicreína (KLK3) es promovida por el péptido con puente disulfuro, cíclico, sintético B-2. Se llevó a cabo el reemplazo del disulfuro con un puente de lactama entre ácido γ -butírico y ácido aspártico. El péptido resultante tenía una estabilidad mejorada en plasma y contra la degradación por KLK3, así como también una actividad superior a B-2 en concentraciones elevadas.

Watkins HA, Rathbone DL, Barwell J, Hay DL, Poyner DR, Structure-activity relationships for α -calcitonin gene-related peptide, *Br J Pharmacol.*, **170**(7), 1308–1322, **2013**, sintetiza estudios de SAR realizados con el péptido relacionado con el gen de la α -calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés), el

análogo más cercano de adrenomedulina. Se hace referencia a un mimético de disulfuro con una lactama como sustituto (ciclo [Asp², Lys⁷]-CGRP), el cual se describe originalmente en: Dennis T, Fournier A, St Pierre S, Quirion R, Structure–activity profile of calcitonin gene–related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther.*, **251**(2), 718–725, **1989**. Este péptido mostró 50 % de disminución de la afinidad hacia el receptor en membranas de bazo de rata. Las mediciones de la actividad biológica en las cámaras del corazón de conejillos de Indias indican una pérdida de función agonista.

Adicionalmente, existen diversos métodos para formar un depósito inyectable de dichos fármacos que involucran el uso de macromoléculas.

Las matrices poliméricas que contienen una molécula farmacológica en un estado no covalentemente unido son bien conocidas. También se pueden inyectar como hidrogeles, micropartículas o micelas. La cinética de liberación de dichos productos farmacológicos puede ser bastante poco confiable con elevada variabilidad entre los pacientes. La producción de dichos polímeros puede dañar la sustancia farmacológica sensible o puede sufrir reacciones colaterales con el polímero durante su degradación [D.H. Lee et al., *J. Contr. Rel.*, **92**, 291–299, **2003**].

La PEGilación permanente de péptidos o proteínas para aumentar su solubilidad, reducir la inmunogenicidad y aumentar la vida media reduciendo la depuración renal es un concepto bien conocido desde principios de 1980 [Caliceti P., Veronese F.M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1261–1277, **2003**]. Para diversos fármacos, esto ha sido utilizado con éxito, pero con muchos ejemplos, la PEGilación reduce la eficacia de la sustancia farmacológica de tal manera que

este concepto ya no es adecuado [T. Peleg–Shulman et al., J. Med. Chem., **47**, 4897–4904, **2004**].

Una alternativa adecuada son los profármacos basados en polímeros. Las presentes definiciones para profármacos por la IUPAC indican los siguientes términos [International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry: GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY (Recommendations 1998); in Pure & Appl. Chem. Vol **70**, No. 5, p. 1129–1143, **1998**]:

Profármacos: Un profármaco es cualquier compuesto que sufre biotransformación antes de exhibir sus efectos farmacológicos. Por ende, los profármacos pueden ser visualizados como fármacos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados utilizados en forma transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables en la molécula progenitora.

Profármaco ligado al portador (profármaco portador): Un profármaco ligado al portador es un profármaco que contiene una ligación temporaria de una sustancia activa determinada con un grupo portador transitorio que produce propiedades fisicoquímicas o farmacocinéticas mejoradas y que puede ser eliminado fácilmente in vivo, generalmente mediante escisión hidrolítica.

Profármaco en cascada: Un profármaco en cascada es un profármaco para el cual la escisión del grupo portador se vuelve efectiva solamente después del desenmascaramiento de un grupo activador.

Existen diversos ejemplos de profármacos portadores basados en PEG, la mayoría de ellos con la necesidad de activación enzimática del ligante entre el fármaco activo y el portador, mayormente iniciada mediante hidrólisis enzimática. Puesto que los ésteres son escindidos muy rápidamente y en forma impredecible

in vivo, los ligantes éster directos para profármaco portador tienen limitaciones en cuanto a su utilidad [J. Rautio et al., *Nature Reviews Drug discovery*, **7**, 255–270, **2008**].

Los métodos alternativos comúnmente empleados son ligantes en cascada unidos a una funcionalidad amina en el péptido o proteína. En los ligantes en cascada, un grupo de enmascaramiento debe ser eliminado como la etapa limitadora de la velocidad en la cascada. Esto activa al ligante para descomponerse en una segunda posición para liberar al péptido o proteína. Comúnmente, el grupo de enmascaramiento puede ser eliminado mediante un mecanismo enzimático [R.B.Greenwald et al. en WO 2002/089789, Greenwald, et al., *J. Med. Chem.* 1999, **42**, 3657–3667, F.M.H. DeGroot et al. en WO 2002/083180 y WO 2004/043493, y D. Shabat et al. en WO 2004/019993].

Una alternativa que no se basa en la activación enzimática es el concepto de U. Hersel et al. en WO 2005/099768. En su método, el grupo de enmascaramiento en un fenol es eliminado en forma puramente dependiente del pH mediante el ataque de un nucleófilo interno. Esto activa al ligante para una posterior descomposición.

Según lo mencionado por U. Hersel et al. en WO 2005/099768, “La desventaja en los sistemas de profármacos antes mencionados descritos por Greenwald, DeGroot y Shabat es la liberación de productos secundarios, de molécula pequeña, aromáticos, potencialmente tóxicos tales como las metidas de quinona después de escisión de la ligación temporaria. Las entidades potencialmente tóxicas son liberadas en una estequiometría 1:1 con el fármaco y pueden asumir concentraciones elevadas in vivo.” El mismo problema es válido para el sistema por Hersel et al. también.

Para moléculas orgánicas pequeñas existe una cantidad de métodos diferentes de profármacos [J. Rautio et al., *Nature Reviews Drug discovery*, **7**, 255–270, **2008**]. El método empleado por U. Hersel et al. como mecanismo de liberación para su grupo de enmascaramiento ha sido utilizado como un método de profármaco para grupos fenólicos de moléculas pequeñas desde principios de 1980. [W.S. Saari in EP 0 296 811 y W.S. Saari et al., *J. Med. Chem.*, Vol **33**, No 1, p 97–101, **1990**].

Los sistemas alternativos de profármacos basados en amina se basan en la hidrólisis lenta de bis–hidroxietilglicina como un profármaco en cascada. Los grupos hidroxilo de la bis–hidroxietilglicina son enmascarados por ésteres que son propensos a hidrólisis mediante esterasas [R. Greenwald et al., *J. Med. Chem.*, **47**, 726–734, **2004**, y D. Vetter et al. en WO 2006/136586].

La escisión puramente dependiente del pH de ligantes es más fiable que la escisión enzimática de ligantes ya que no es dependiente de las concentraciones enzimáticas que pueden variar en los sistemas vivos.

Un concepto de ligantes que son escindidos en forma dependiente del pH son los profármacos basados en eliminación beta con velocidades ajustables de descomposición según lo descrito por Santi et al. en US 8.680.315. La tecnología descrita de los ligantes para unir de manera reversible las macromoléculas a péptidos y moléculas pequeñas es aplicable a diversos grupos funcionales en el fármaco liberado. Las aminas, los alcoholes, los ácidos carboxílicos y los tioles se pueden unir por medio de un sistema adaptador al resto eliminador beta. Luego de la descomposición activada por el pH, el fármaco es liberado tras la liberación de CO₂ y un fragmento insaturado es unido a la macromolécula.

Otro método optimizado para fenoles básicamente tirosina en péptidos se basa en un carbamato el cual es atacado en forma dependiente del pH por una amina nucleófila bajo liberación del fenol y generación de una urea cíclica unida a la macromolécula según lo descrito por Flamme I. et al en WO 2013/064455.

Otros restos heterólogos establecidos para el ajuste de las propiedades farmacocinéticas de péptidos incluyen polímeros, incluyendo ácidos carboxílicos C₃–C₁₀₀ lineales o ramificados (lipidación), un resto polietilenglicol (PEG), un resto polipropilenglicol (PPG), un resto PAS, el cual es una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente residuos de alanina, serina, y prolina, formando la secuencia de aminoácidos una conformación de espiral al azar bajo condiciones fisiológicas [US No. 2010/0292130 y WO 2008/155134], y un resto hidroxietilalmidón (HES, por sus siglas en inglés) [WO 02/080979], un Fc, un ligando de unión a FcRn, albúmina y un ligando de unión a albúmina.

El ajuste de las propiedades farmacocinéticas de péptidos mediante lipidación es una metodología bien desarrollada. La lipidación puede ocurrir en el término N o en las funcionalidades de cadenas laterales de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica. La lipidación es descrita en una cantidad de publicación y patentes según lo ejemplificado en las siguientes revisiones: Zhang L, Bulaj G, Converting peptides into drug leads by lipidation, *Curr Med Chem.*; **19**(11):1602–18, **2012**, o M. Gerauer, S. Koch, H. Waldmann, L. Brunsfeld, Lipidated peptide synthesis: Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, Tomo **2**, 520–530, **2009**, (Hrsg. Begley, T. P.). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. La lipidación de un fragmento de ADM truncado es descrita en WO 2012/138867.

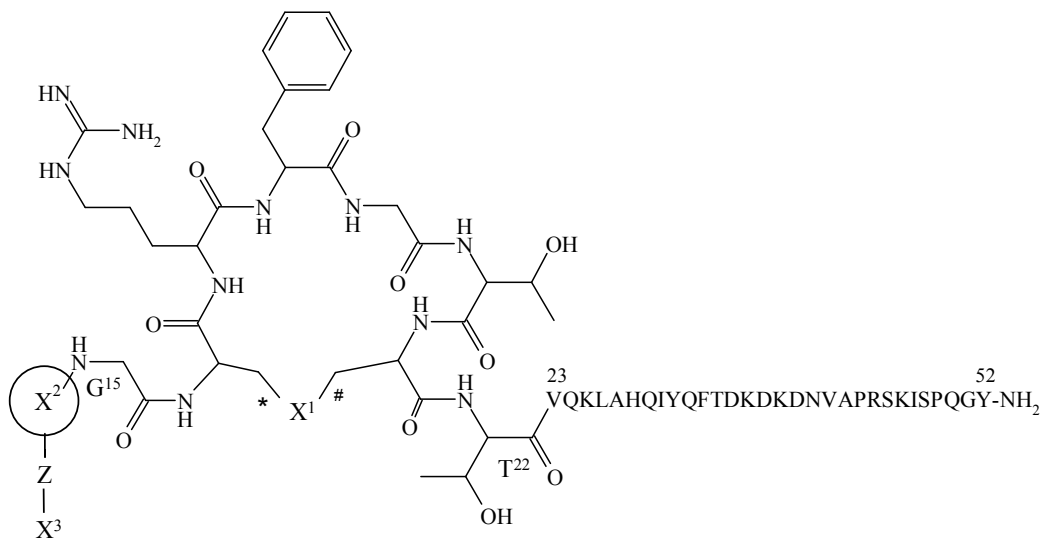
Los derivados de adrenomedulina marcados para utilizar como agentes para la toma de imágenes y también como agente terapéutico son conocidos [J. Depuis et al. en CA 2567478 y WO 2008/138141]. En estos derivados de ADM, se adhirió una estructura molecular del tipo jaula complejante capaz de unirse a isótopos radiactivos al extremo N terminal de ADM en forma directa o por medio de una unidad espaciadora que también incluye potencialmente espaciadores cortos de PEG. El valor de diagnóstico o terapéutico de estos fármacos surge de la administración dirigida de la molécula radiactiva.

En contraste con los métodos de profármacos mencionados anteriormente, los cuales son todos basados en el enmascaramiento de las funcionalidades de amina, otro método descrito en WO 2013/064508 se basa en el enmascaramiento del grupo fenólico de una tirosina en ADM. Se utiliza un profármaco ligado a un portador, sobre la base de la escisión interna asistida por nucleófilos de un carbamato en este grupo fenólico. La ventaja clave con respecto a otras clases de profármacos mencionadas con anterioridad es la inocuidad toxicológica del producto de descomposición del ligante, una urea cíclica unida permanentemente al portador. Adicionalmente, la descomposición del profármaco no depende de los mecanismos enzimáticos que pudieran causar una elevada variabilidad entre los pacientes de la cinética de escisión. El mecanismo de escisión es solamente dependiente del pH ya que una amina interna que es protonada a pH ácido se activa a pH más alto (neutro) para actuar como un nucleófilo que ataca al carbamato fenólico basado en la tirosina.

En el contexto de la presente invención, se describen ahora derivados peptídicos de ADM biológicamente activos, estabilizados, donde se reemplazó el puente disulfuro de los derivados peptídicos de ADM. Opcionalmente, se

modificaron adicionalmente estos derivados peptídicos de ADM modificados mediante N-Metilación o mediante ligación covalente del derivado peptídico a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en un polímero, un Fc, un ligando de unión a FcRn, albúmina y un ligando de unión a albúmina. El polímero que es ligado covalentemente al derivado peptídico se selecciona del grupo que consiste en ácidos carboxílicos C₃-C₁₀₀ lineales o ramificados, opcionalmente sustituidos, saturados o mono- o di-insaturados, preferentemente ácidos carboxílicos C₄-C₃₀, un resto PEG, un resto PPG, un resto PAS y un resto HES. Se investigaron los análogos por medio de la actividad y estabilidad. Se ha demostrado que la actividad de los derivados de ADM es retenida en comparación con ADM wt (tipo salvaje). Adicionalmente, los derivados peptídicos de ADM estabilizados muestran un aumento de la vida media en sangre y en hígado, como puede ser demostrado mediante ensayos de estabilidad en homogenados séricos y hepáticos. Los péptidos de ADM estabilizados muestran una duración prolongada del efecto farmacológico en comparación con ADM y sobre la base de este mecanismo específico de acción – después de la administración parenteral – ejercen efectos antiinflamatorios y hemodinámicos sostenidos *in vivo* tal como la estabilización de la función de barrera endotelial, y reducción de la presión sanguínea, respectivamente.

La presente invención provee compuestos de fórmula (I)



(I)

donde X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0-6; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0-6;

$^*-(CH_2)_{m3}-^{\#}$, donde $m3$ es 1-8;

$^*-(CH_2)_{m4}-(CH_2=CH_2)-(CH_2)_{n1}-^{\#}$, donde $m4$ es 0-6, $n1$ es 0-6, con la condición de que $m4+n1=0-6$;

$^*-(CH_2)_{m5}-(CH\equiv CH)-(CH_2)_{n2}-^{\#}$, donde $m5$ es 0-6, y $n2$ es 0-6, con la condición de que $m5+n2=0-6$;

$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0-4, y $n3$ es 0-4, con la condición de que $m6+n3=0-6$; $^{\#}-(CH_2)_{m7}-CO-NH-(CH_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 0-4, y $n4$ es 0-4, con la condición de que $m7+n4=0-6$;

$^*-(SO)-(CH_2)_{m8}-^{\#}$, donde $m8$ es 0-6; $^{\#}-(SO)-(CH_2)_{m9}-^*$, donde $m9$ es 0-6;

$^*-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_{m10}-^\#$, donde m10 es 0-6; $^\#-\text{SO}_2-(\text{CH}_2)_{m11}-^*$, donde m11 es 0-6;

$^*-\text{heteroarilo de 5-6 miembros}-^\#$;

$^*-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m12}-^\#$, donde m12 es 0-6; $^\#-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m13}-^*$, donde m13 es 0-6;

$^*-\text{CH}_2-\text{S}-(\text{CH}_2)_{m14}-^\#$, donde m14 es 0-6; $^\#-\text{CH}_2-\text{S}-(\text{CH}_2)_{m15}-^*$, donde m15 es 0-6;

$^*-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m16}-^\#$, donde m16 es 0-6; $^\#-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m17}-^*$, donde m17 es 0-6;

$^*-(\text{CH}_2)_{m18}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n5}-^\#$, donde m18 es 0-3, y n5 es 0 o 1, con la condición de que $m18+n5=0-3$; $^\#-(\text{CH}_2)_{m19}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n6}-^*$, donde m19 es 0-3, y n6 es 0 o 1, con la condición de que $m19+n6=0-3$;

$^*-(\text{CH}_2)_{m20}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n7}-^\#$, donde m20 es 0-3, y n7 es 0 o 1, con la condición de que $m20+n7=0-3$; $^\#-(\text{CH}_2)_{m21}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n8}-^*$, donde m21 es 0-3, y n8 es 0 o 1, con la condición de que $m21+n8=0-3$;

$^*-(\text{CH}_2)_{m22}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n9}-^\#$, donde m22 es 0-3, y n9 es 0 o 1, con la condición de que $m22+n9=0-3$; $^\#-(\text{CH}_2)_{m23}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2)-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{n10}-^*$, donde m23 es 0-3, y n10 es 0 o 1, con la condición de que $m23+n10=0-3$;

$^*-(CH_2)_{m24}-NH-CO-CH(CH(CH_3)C_2H_5)-NH-CO-(CH_2)_{n11}-^{\#}$, donde m24 es 0–3, y n11 es 0 o 1, con la condición de que $m24+n11=0-3$; $^{\#}-(CH_2)_{m25}-NH-CO-CH(CH(CH_3)C_2H_5)-NH-CO-(CH_2)_{n12}-^*$, donde m25 es 0–3, y n12 es 0 o 1, con la condición de que $m25+n12=0-3$;

$^*-(CH_2)_{m26}-NH-CO-CH(CH_2(C_6H_5))-NH-CO-(CH_2)_{n13}-^{\#}$, donde m26 es 0–3, y n13 es 0 o 1, con la condición de que $m26+n13=0-3$; $^{\#}-(CH_2)_{m27}-NH-CO-CH(CH_2(C_6H_5))-NH-CO-(CH_2)_{n14}-^*$, donde m27 es 0–3, y n14 es 0 o 1, con la condición de que $m27+n14=0-3$;

$^*-(CH_2)_{m28}-NH-CO-(CH_2)_3-NH-CO-(CH_2)_{n15}-^{\#}$, donde m28 es 0 o 1, y n15 es 0 o 1, con la condición de que $m28+n15=0-1$; $^{\#}-(CH_2)_{m29}-NH-CO-(CH_2)_3-NH-CO-(CH_2)_{n16}-^*$, donde m29 es 0 o 1, y n16 es 0 o 1, con la condición de que $m29+n16=0-1$;

$^*-(CH_2)_{m30}-NH-CO-NH-(CH_2)_{n17}-^{\#}$, donde m30 es 0–5, y n17 es 0–5, con la condición de que $m30+n17=0-5$; $^{\#}-(CH_2)_{m31}-NH-CO-NH-(CH_2)_{n18}-^*$, donde m31 es 0–5, y n18 es 0–5, con la condición de que $m31+n18=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m32}-O-CO-NH-(CH_2)_{n19}-^{\#}$, donde m32 es 0–5, y n19 es 0–5, con la condición de que $m32+n19=0-5$; $^{\#}-(CH_2)_{m33}-O-CO-NH-(CH_2)_{n20}-^*$, donde m33 es 0–5, y n20 es 0–5, con la condición de que $m33+n20=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m34}-O-CO-O-(CH_2)_{n21}-^{\#}$, donde m 34 es 0–5, y n21 es 0–5, con la condición de que $m34+n21=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m35}-NH-CO-(CH_2)_{n22}-NH-(CH_2)_{p1}-$, donde m35 es 0–4, n22 es 0–4, y p1 es 0–4, con la condición de que $m35+n22+p1=0-4$; y

$^*-(CH_2)_{m36}-NH-CO-(CH=CH)-CO-NH-(CH_2)_{n23}-^{\#}$, donde m36 es 0–2, y n23 es 0–2, con la condición de que $m36+n23=0-2$;

donde * y $^{\#}$ reflejan donde X^1 está unido dentro de la estructura del anillo;

X^2 está ausente, es hidrógeno, o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en G^{14} , K^{14} , F^{14} , SEC ID NO:1 [$Y^1RQSMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:2 [$R^2QSMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:3 [$Q^3SMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:4 [$S^4MNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:5 [$M^5NNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:6 [$N^6NFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:7 [$N^7FQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:8 [$F^8QGLRSF^{14}$], SEC ID NO:9 [Q^9GLRSF^{14}], SEC ID NO:10 [$G^{10}LRSF^{14}$], SEC ID NO:11 [$L^{11}RSF^{14}$], SEC ID NO:12 [$R^{12}SF^{14}$], y SEC ID NO:13 [$S^{13}F^{14}$], el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} de la secuencia de aminoácidos de fórmula (I), donde cualquier aminoácido de X^2 puede ser reemplazado opcionalmente por un aminoácido natural o no natural;

donde A es L-Alanina; R es L-Arginina; N es L-Asparagina; D es ácido L-aspartico; Q es L-Glutamina; G es L-Glicina; H es L-Histidina; I es L-Isoleucina; L es L-Leucina; K es L-Lisina; M es L-Metionina; F es L-Fenilalanina; P es L-Prolina; S es L-Serina; T es L-Treonina; Y es L-Tirosina; V es L-Valina;

donde la numeración de aminoácidos en la fórmula (I) y en la definición de X^2 se refiere a la secuencia de ADM humana correspondiente;

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal o a un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 , al extremo N-terminal de G^{15} o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de cualquier aminoácido de X^2 o de G^{15} y X^3 o entre un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 y X^3

donde si X^3 está ausente, entonces

Z está también ausente y X^2 es hidrógeno o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos según lo definido anteriormente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces

X^2 está ausente o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos según lo definido anteriormente; Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de cualquier aminoácido de X^2 o de G^{15} y X^3 o entre un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 y X^3 ;

o su sal, solvato, o solvato de una sal fisiológicamente aceptable.

Existen informes en cuanto a que la sustitución de enlaces disulfuro con puentes lactama, así como también la introducción de N-metilación y palmitoilación pueden aumentar la estabilidad metabólica de los péptidos reteniendo al mismo tiempo la actividad biológica. Sin embargo, según lo

informado, por ejemplo, por Watkins HA, Rathbone DL, Barwell J, Hay DL, Poyner DR, Structure–activity relationships for α -calcitonin gene–related peptide, *Br J Pharmacol.* **2013**, 170(7), 1308–1322 y Dennis T, Fournier A, St Pierre S, Quirion R, Structure–activity profile of calcitonin gene–related peptide in peripheral y brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J.Pharmacol Exp Ther.* **1989**, 251(2), 718–725, el reemplazo del puente disulfuro en miembros de la superfamilia de calcitonina de péptidos no se correlacionaba con la actividad retenida. Adicionalmente, si bien se describen cambios únicos de estructuras peptídicas, las combinaciones de, por ejemplo, miméticos de enlaces disulfuro, N–metilación y/o palmitoilación son impredecibles con respecto a las relaciones estructura–actividad.

ADM y otros miembros de los péptidos relacionados con calcitonina son conocidos por la rápida inactivación mediante escisión del puente disulfuro. Sin embargo, la sustitución de retención de actividad y al mismo tiempo de prolongación de la vida media de este puente disulfuro – incluso con alteración del tamaño del anillo intramolecular – no es conocida en la técnica y no se hubiese esperado.

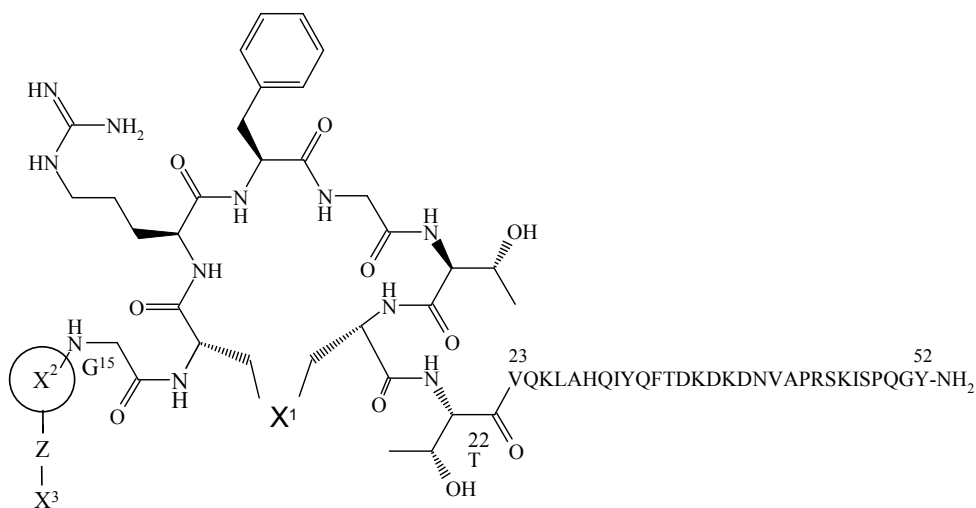
Los compuestos de acuerdo con la invención son los compuestos de la fórmula (I) y las sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, los compuestos los cuales se encuentran abarcados por la fórmula (I) y son de las fórmulas especificadas más adelante y las sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, y los compuestos que se encuentran abarcados por la fórmula (I) y son especificados más adelante como ejemplos de trabajo y sales de los mismos, solvatos de los mismos y solvatos de las sales de los mismos, si los compuestos que están

abarcados por la fórmula (I) y son especificados más adelante no son aún sales, solvatos y solvatos de las sales.

Dependiendo de su estructura, los compuestos de acuerdo con la invención pueden existir en formas estereoisoméricas (enantiómeros, diastereómeros). Por consiguiente, la invención abarca a los enantiómeros o diastereómeros y a sus mezclas particulares. Los constituyentes estereoisoméricamente homogéneos pueden ser aislados en forma conocida de dichas mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros.

Cuando los compuestos de acuerdo con la invención puede presentarse en formas tautoméricas, la presente invención abarca a todas las formas tautoméricas.

Los ejemplos de formas estereoisoméricas de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención son compuestos de las fórmulas (I) según lo definido anteriormente, donde todos los aminoácidos tienen la configuración L:



La presente invención comprende todas las formas estereoisoméricas posibles, también en los casos en que no se indica estereoisomerismo alguno.

La presente invención abarca además todas las variantes isotópicas adecuadas de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención. En la presente, una variante isotópica de un compuesto de acuerdo con la invención se entiende que significa un compuesto en el cual al menos un átomo dentro del compuesto de acuerdo con la invención ha sido intercambiado por otro átomo del mismo número atómico, aunque con una masa atómica diferente a la masa atómica que se presenta generalmente o predominantemente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos los cuales pueden ser incorporados en un compuesto de acuerdo con la invención son aquellos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro, bromo y yodo, tales como ^2H (deuterio), ^3H (tritio), ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{33}S , ^{34}S , ^{35}S , ^{36}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{129}I y ^{131}I . Las variantes isotópicas particulares de un compuesto de acuerdo con la invención, especialmente aquellas en las cuales se han incorporado uno o más isótopos radiactivos, pueden ser beneficiosas, por ejemplo, para examinar el mecanismo de acción o de la distribución del compuesto activo en el cuerpo; debido a la capacidad de preparación y detección comparativamente fáciles, especialmente los compuestos marcados con isótopos ^3H o ^{14}C son adecuados para este propósito. Adicionalmente, la incorporación de isótopos, por ejemplo de deuterio, puede conducir a beneficios terapéuticos particulares como consecuencia de una mayor estabilidad metabólica del compuesto, por ejemplo una extensión de la vida media en el cuerpo o una reducción en la dosis activa requerida; tales modificaciones de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención, por lo tanto, en algunos casos también puede constituir una

realización preferida de la presente invención. Las variantes isotópicas de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante procesos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante los métodos descritos más adelante y los métodos descritos en los ejemplos de trabajo, utilizando modificaciones isotópicas correspondientes de los reactivos y/o compuestos de partida particulares allí.

Adicionalmente, la presente invención incluye además profármacos de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención. El término "profármacos" aquí designa compuestos los cuales en sí mismos pueden ser biológicamente activos o inactivos, que son convertidos (por ejemplo metabólicamente o hidrolíticamente) en compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención durante su tiempo de permanencia en el cuerpo. En el contexto de la presente invención, las sales preferidas son sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención. Se incluyen también las sales que no son adecuadas en sí mismas para aplicaciones farmacéuticas, aunque, por ejemplo, pueden utilizarse para el aislamiento o purificación de los compuestos de acuerdo con la invención.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención incluyen sales de adición de ácidos minerales, ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, por ejemplo sales de ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido benzoico.

Las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de acuerdo con

la invención incluyen además sales de bases habituales, por ejemplo y con preferencia, sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sales de calcio y magnesio) y sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas que tienen 1 a 16 átomos de carbono, por ejemplo y con preferencia etilamina, dietilamina, trietilamina, etildiisopropilamina, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, dicitclohexilamina, dimetilaminoetanol, procaína, dibencilamina, *N*-metilmorfolina, arginina, lisina, etilendiamina y *N*-metilpiperidina.

En el contexto de la invención, solvatos se refieren a aquellas formas de los compuestos de acuerdo con la invención las cuales, en estado sólido o líquido, forman un complejo mediante coordinación con moléculas solventes. Los hidratos son una forma específica de solvatos, en donde la coordinación es con agua. Los solvatos preferidos en el contexto de la presente invención son hidratos.

Las definiciones de radicales específicos proporcionadas en las combinaciones particulares o combinaciones preferidas de radicales son, sin importar la combinación particular del radical especificado, también reemplazadas por cualquiera de las definiciones de radicales de otras combinaciones.

Se prefieren muy especialmente las combinaciones de dos o más de los rangos preferidos antes mencionados.

La invención provee además un proceso para preparar los compuestos de la fórmula (I) y (Ia), o las sales de los mismos, solvatos de los mismos o los solvatos de las sales de los mismos, donde los compuestos de la fórmula (II)

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0–6; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0–6;

$^*-(CH_2)_{m3}-^{\#}$, donde $m3$ es 1–8;

$^*-(CH_2)_{m4}-(CH_2=CH_2)-(CH_2)_{n1}-^{\#}$, donde $m4$ es 0–6, $n1$ es 0–6, con la condición de que $m4+n1=0-6$;

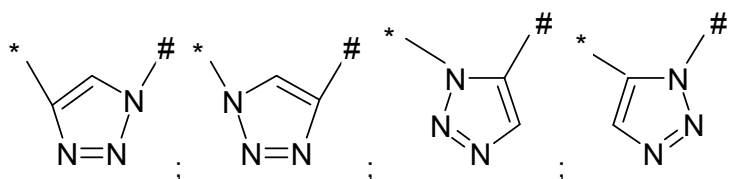
$^*-(CH_2)_{m5}-(CH\equiv CH)-(CH_2)_{n2}-^{\#}$, donde $m5$ es 0–6, y $n2$ es 0–6, con la condición de que $m5+n2=0-6$;

$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0–4, y $n3$ es 0–4, con la condición de que $m6+n3=0-6$; $^{\#}-(CH_2)_{m7}-CO-NH-(CH_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 0–4, y $n4$ es 0–4, con la condición de que $m7+n4=0-6$;

$^*-SO-(CH_2)_{m8}-^{\#}$, donde $m8$ es 0–6; $^{\#}-SO-(CH_2)_{m9}-^*$, donde $m9$ es 0–6;

$^*-SO_2-(CH_2)_{m10}-^{\#}$, donde $m10$ es 0–6; $^{\#}-SO_2-(CH_2)_{m11}-^*$, donde $m11$ es 0–

6;



donde * y $^{\#}$ indican la dirección de unión dentro del anillo, respectivamente, y

X^2 , X^3 y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X¹ se selecciona del grupo que consiste en

^{*}-(CH₂)_{m1}-S-[#], donde m1 es 0-4; [#]-(CH₂)_{m2}-S-^{*}, donde m2 es 0-4;

^{*}-(CH₂)_{m3}-[#], donde m3 es 1-6;

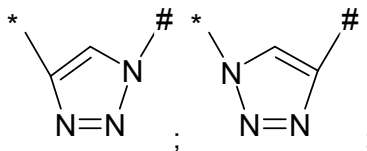
^{*}-(CH₂)_{m4}-(CH₂=CH₂)-(CH₂)_{n1}-[#], donde m4 es 0-4, n1 es 0-4, con la condición de que m4+n1=0-4;

^{*}-(CH₂)_{m5}-(CH≡CH)-(CH₂)_{n2}-[#], donde m5 es 0-4, y n2 es 0-4, con la condición de que m5+n2=0-4;

^{*}-(CH₂)_{m6}-CO-NH-(CH₂)_{n3}-[#], donde m6 es 0-4, y n3 es 0-4, con la condición de que m6+n3=0-4; [#]-(CH₂)_{m7}-CO-NH-(CH₂)_{n4}-^{*}, donde m7 es 0-4, y n4 es 0-4, con la condición de que m7+n4=0-4;

^{*}-SO-(CH₂)_{m8}-[#], donde m8 es 0-4; [#]-SO-(CH₂)_{m9}-^{*}, donde m9 es 0-4;

^{*}-SO₂-(CH₂)_{m10}-[#], donde m10 es 0-4; [#]-SO₂-(CH₂)_{m11}-^{*}, donde m11 es 0-4;



donde * y # indican la dirección de unión dentro del anillo, respectivamente, y

X², X³ y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0–6; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0–6;

$^*-(CH_2)_{m3}-^{\#}$, donde $m3$ es 1–8;

$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0–4, y $n3$ es 0–4, con la condición de que $m6+n3=0-6$;

$^{\#}-(CH_2)_{m7}-CO-NH-(CH_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 0–4, y $n4$ es 0–4, con la condición de que $m7+n4=0-6$;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} , o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

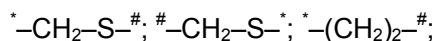
donde si X^3 está ausente, entonces Z está también ausente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en



$^*\text{--(CH}_2)_{m6}\text{--CO--NH--(CH}_2)_{n3}\text{--}^\#$, donde $m6$ es 0 o 1 y $n3$ se selecciona entre 0, 1, 2, 3;

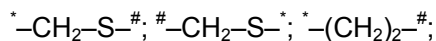
$^\#\text{--(CH}_2)_{m7}\text{--CO--NH--(CH}_2)_{n4}\text{--}^*$, donde $m7$ es 0 o 1 y $n4$ se selecciona entre 0, 1, 2, 3;

donde * y $^\#$ indican la dirección de unión dentro del anillo, respectivamente, y X^2 , X^3 y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en



$^*\text{--(CH}_2)_{m6}\text{--CO--NH--(CH}_2)_{n3}\text{--}^\#$, donde $m6$ es 1 y $n3$ se selecciona entre 0, 1, y 3; o $m6$ es 0 y $n3$ se selecciona entre 0, 1, y 2;

$^{\#}-(\text{CH}_2)_{m7}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 1 y $n4$ se selecciona entre 0, 1, y 3; o $m7$ es 0 y $n4$ se selecciona entre 0, 1, y 2;

donde * y $^{\#}$ indican la dirección de unión dentro del anillo, respectivamente, y X^2 , X^3 y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-\text{CH}_2-\text{S}-^{\#}$; $^{\#}-\text{CH}_2-\text{S}-^*$;

$^*-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-^{\#}$; $^*-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-^{\#}$; $^*-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-^{\#}$; $^*-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-^{\#}$;

$^{\#}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}^*$;

donde * y $^{\#}$ indican la dirección de unión dentro del anillo, respectivamente;

X^2 es según lo definido anteriormente;

X^3 está ausente o es ácido palmítico; y

Z está ausente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0–6; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0–6;

$^*-(CH_2)_{m3}-^{\#}$, donde $m3$ es 1–8;

$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0–4, y $n3$ es 0–4, con la condición de que $m6+n3=0-6$;

$^{\#}-(CH_2)_{m7}-CO-NH-(CH_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 0–4, y $n4$ es 0–4, con la condición de que $m7+n4=0-6$; y

X^2 , X^3 y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0–4; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0–4;

$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0-4, y $n3$ es 0-4, con la condición de que $m6+n3=0-6$;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} , o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

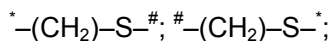
donde si X^3 está ausente, entonces Z también está ausente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en



$^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^\#$, donde $m6$ es 0 o 1, y $n3$ se selecciona entre 1, 2, y 3;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} , o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

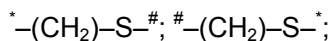
donde si X^3 está ausente, entonces Z también está ausente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 se selecciona del grupo que consiste en



$^{*}-(\text{CH}_2)_{m6}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0 o 1, y $n3$ se selecciona entre 1, 2, y 3;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 es ácido palmítico el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} ;

Z está ausente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 es según lo definido anteriormente;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I); y

X^3 y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 y X^2 son según lo definido anteriormente;

X^3 es un polímero y el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácidos carboxílicos C_3-C_{100} lineales o ramificados, preferentemente ácidos carboxílicos C_4-C_{30} , opcionalmente sustituidos con halo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, o fosfato, y los cuales pueden ser saturados, o mono- o di-insaturados; y

Z es según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 y X^2 son según lo definido anteriormente;

X^3 es un polímero y el polímero es un resto PEG; y

Z es según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^1 y X^2 son según lo definido anteriormente;

X^3 es un resto heterólogo; y

Z es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de cualquier aminoácido de X^2 o de G^{15} y X^3 o entre un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

al menos uno de los aminoácidos de X^2 ha sido reemplazado por un aminoácido natural o no natural; y

X^1 , X^3 , y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos

Dentro del significado de la presente invención, los aminoácidos naturales son definidos como aminoácidos peptidogénicos. Dentro del significado de la presente invención, los aminoácidos no naturales son definidos como aminoácidos no peptidogénicos insertados en los péptidos de acuerdo con la invención, incluyendo:

Diaminodiácidos, los cuales están dentro del significado de esta invención definidos como aminoácidos que tienen dos grupos amino y dos grupos carboxilo. Los diaminodiácidos pueden formar enlaces amida con dos aminoácidos adicionales. Los ejemplos de diaminodiácidos son cistationina y ácido 2,7-diaminosubérico;

Los diaminoácidos, los cuales están dentro del significado de esta invención definidos como aminoácidos que tienen un segundo grupo amino. Los ejemplos de diaminoácidos son 3-aminoalanina (Dpr), ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), ácido alfa, gamma diamino butírico (Dbu), y ácido 2,5 diaminopentanoico (Orn); D-aminoácidos, utilizándose alanina sustituida heterocíclica como reemplazo para fenilalanina, y aminoácidos halogenados.

De acuerdo con una realización de la invención, el compuesto de fórmula (I) es definido de la siguiente manera:

X^3 es un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en un polímero, un Fc, un ligando de unión a FcR_n , albúmina y un ligando de unión a albúmina;

y X^1 , X^2 , y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

Dentro del significado de la presente invención, el término “restos heterólogos” incluye un polímero, un Fc, un ligando de unión a FcR_n , albúmina y un ligando de unión a albúmina.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^3 es un polímero y el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácidos carboxílicos C_3 – C_{100} lineales o ramificados, preferentemente ácidos carboxílicos C_4 – C_{30} , opcionalmente sustituidos con halo, hidroxi, alcoxi, amino,

alquilamino, dialquilamino, sulfato, o fosfato, y los cuales pueden estar saturados, o mono- o diinsaturados, un resto PEG, un resto PPG, un resto PAS y un resto HES; y

X^1 , X^2 , y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

De acuerdo con una realización de la invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

X^3 es un ácido carboxílico seleccionado del grupo que consiste en ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido ceroplástico, ácido cerótico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido elaídico, ácido enántico, ácido erúcico, ácido gédico, ácido henatriacontílico, ácido heneicosílico, ácido heptacosílico, ácido hexatriacontílico, ácido laceroico, ácido láurico, ácido lignocérico, ácido linoelaídico, ácido linoleico, ácido margárico, ácido melísico, ácido montánico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido nonacosílico, ácido nonadecílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido pantoténico, ácido pelargónico, ácido pentacosílico, ácido pentadecílico, ácido sílico, ácido sapiénico, ácido esteárico, ácido tricosílico, ácido tridecílico, ácido undecílico, ácido vaccénico, ácido valérico, ácido α -linolénico y derivados de los mismos; y

X^1 , X^2 , y Z son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal

de los mismos.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, el resto heterólogo es un resto polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) conocido en la técnica. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado.

Para el polietilenglicol, en una realización, el peso molecular está entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa para facilitar su manipuleo y fabricación. Pueden emplearse otros tamaños, dependiendo del perfil deseado (por ejemplo, la duración de liberación sostenida deseada, los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipuleo, el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol a un péptido o análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, o 100.000 kDa. En algunas realizaciones, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Los polietilenglicoles ramificados son descritos, por ejemplo, en la Pat. Estadounidense No. 5.643.575; Morpurgo et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59–72 (1996); Vorobjev et al, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745–2750 (1999); y Caliceti et al., *Bioconjug. Chem.* 10:638–646 (1999).

En otras realizaciones, el resto heterólogo es una secuencia PAS. Una

secuencia PAS, en el presente contexto, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente residuos de alanina, serina, y prolina, donde la secuencia de aminoácidos forma una conformación de espiral al azar bajo condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácidos, o un casete de secuencia que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en alanina, serina, y prolina que pueden utilizarse como una parte del resto heterólogo en el compuesto procoagulante. No obstante, el experto en la técnica tiene conocimiento de que un polímero de aminoácido también puede formar una conformación de espiral al azar cuando se agregan residuos que no son alanina, serina, y prolina como un constituyente menor en la secuencia PAS. El término "constituyente menor " en el presente contexto significa que pueden agregarse aminoácidos diferentes de alanina, serina, y prolina en la secuencia PAS en cierta medida, por ejemplo, hasta aproximadamente 12%, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente 10%, es decir aproximadamente 10 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente 9%>, es decir, aproximadamente 9 de 100 aminoácidos, hasta aproximadamente 8%>, es decir, aproximadamente 8 de 100 aminoácidos, aproximadamente 6%>, es decir, aproximadamente 6 de 100 aminoácidos, aproximadamente 5%>, es decir, aproximadamente 5 de 100 aminoácidos, aproximadamente 4%>, es decir, aproximadamente 4 de 100 aminoácidos, aproximadamente 3%>, es decir, aproximadamente 3 de 100 aminoácidos, aproximadamente 2%>, es decir, aproximadamente 2 de 100 aminoácidos, aproximadamente 1%>, es decir, aproximadamente 1 de 100 de los aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de

alanina, serina y prolina pueden ser seleccionados del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gin, Glu, Gly, His, He, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, y Val. Bajo condiciones fisiológicas, el tramo de la secuencia PAS forma una conformación de espiral al azar y de ese modo puede mediar en un aumento de la estabilidad in vivo y/o in vitro al compuesto procoagulante. Puesto que el dominio de espiral al azar no adopta una estructura o función estable por sí mismo, la actividad biológica mediada por los polipéptidos Pepl y/o Pep2 en el compuesto procoagulante es esencialmente conservada. En otras realizaciones, las secuencias PAS que forman un dominio de espiral al azar son biológicamente inertes, especialmente con respecto a la proteólisis en plasma sanguíneo, inmunogenicidad, punto isoeléctrico/ comportamiento electrostático, unión a receptores de superficie celular o internalización, aunque aún son biodegradable, lo cual proporciona ventajas claras con respecto a los polímeros sintéticos tal como PEG.

Los ejemplos no limitantes de las secuencias PAS que forman una conformación de espiral al azar comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA, AAPASPAPAAPSAPAPAAPS, APSSPSPSAPSSPSPASPSS, APSSPSPSAPSSPSPASPS, SSPSAPSPSSPASPSPPSPA, AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA, y AS AAAP AAAS AAAS AP S AAA, o cualquiera de sus combinaciones. Los ejemplos adicionales de secuencias PAS son conocidos de, por ejemplo, Publ. Pat. Estadounidense No. 2010/0292130 AI y Publ. Solicitud PCT No. WO 2008/155134 AI.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es hidroxietil almidón (HES) o

un derivado del mismo. El hidroxietil almidón (HES) es un derivado de amilopectina de presentación natural y es degradado por alfa-amilasa en el cuerpo. HES es un derivado sustituido del polímero de carbohidratos amilopectina, que está presente en el almidón de maíz en una concentración de hasta 95% en peso. HES exhibe propiedades biológicas ventajosas y se utiliza como un agente de reemplazo del volumen sanguíneo y en terapia de hemodilución en la clínica (Sommermeyer et al., *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271–278 (1987); y Weidler et al, *Arzneim.–Forschung/Drug Res.*, 41, 494–498 (1991)).

La amilopectina contiene restos de glucosa, donde en la cadena principal están presentes enlaces alfa- 1,4- glucosídicos y en los sitios de ramificación se encuentran enlaces alfa- 1,6-glucosídicos. Las propiedades fisicoquímicas de esta molécula son principalmente determinadas por el tipo de enlaces glucosídicos. Debido al enlace alfa- 1,4-glucosídico mellado, se producen estructuras helicoidales con aproximadamente seis monómeros de glucosa por vuelta. Se pueden modificar las propiedades fisicoquímicas así como también las propiedades bioquímicas del polímero mediante sustitución. Se puede lograr la introducción de un grupo hidroxietilo por medio de hidroxietilación alcalina. Mediante la adaptación de las condiciones de reacción, es posible aprovechar la reactividad diferente del grupo hidroxilo respectivo en el monómero de glucosa insustituido con respecto a una hidroxietilación. Debido a esto, el experto en la técnica es capaz de influir sobre el patrón de sustitución en forma limitada.

HES es principalmente caracterizado por la distribución del peso molecular y el grado de sustitución. El grado de sustitución, denotado como DS

(por sus siglas en inglés), se refiere a la sustitución molar, es conocido por el experto en la técnica. Véase Sommermeyer et al., *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271–278 (1987), como es citado con anterioridad, en particular p. 273.

En una realización, el hidroxietil almidón tiene un peso molecular medio (media ponderada) de entre 1 y 300 kD, entre 2 y 200kD, entre 3 y 100 kD, o entre 4 y 70kD. Hidroxietil almidón puede exhibir adicionalmente un grado molar de sustitución entre 0,1 y 3, preferentemente entre 0,1 y 2, más preferentemente, entre 0,1 y 0,9, preferentemente entre 0,1 y 0,8, y una relación entre C2:C6 de sustitución en el rango entre 2 y 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. Un ejemplo no limitante de HES que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es un HES con un grado de sustitución de 0,2 a 0,8 tal como 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, o 0,8, preferentemente de 0,4 a 0,7 tal como 0,4, 0,5, 0,6, o 0,7. En una realización específica, HES con un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es VOLUVEN® de Fresenius. VOLUVEN® es un coloide artificial, empleado, por ejemplo, para el reemplazo de volumen empleado en la indicación terapéutica para la terapia y profilaxis de la hipovolemia. Las características de VOLUVEN® son un peso molecular medio de 130.000+/-20.000 D, una sustitución molar de 0,4 y una relación C2:C6 de aproximadamente 9: 1. En otras realizaciones, los rangos del peso molecular medio de hidroxietil almidón son, por ejemplo, de 4 a 70 kD o de 10 a 70 kD o de 12 a 70 kD o de 18 a 70 kD o de 50 a 70 kD o de 4 a 50 kD o de 10 a 50 kD o de 12 a 50 kD o de 18 a 50 kD o de 4 a 18 kD o de 10 a 18 kD o de 12 a 18 kD o de 4 a 12 kD o de 10 a 12 kD o de 4 a 10 kD. En aún otras realizaciones, el peso molecular medio de hidroxietil almidón empleado está en el rango entre más de 4 kD y por debajo de 70 kD, tal como aproximadamente 10 kD, o en el rango entre

9 y 10 kD o entre 10 y 11 kD o entre 9 y 11 kD, o aproximadamente 12 kD, o en el rango entre 11 y 12 kD) o entre 12 y 13 kD o entre 11 y 13 kD, o aproximadamente 18 kD, o en el rango entre 17 y 18 kD o entre 18 y 19 kD o entre 17 y 19 kD, o aproximadamente 30 kD, o en el rango entre 29 y 30, o entre 30 y 31 kD, o aproximadamente 50 kD, o en el rango entre 49 y 50 kD o entre 50 y 51 kD o entre 49 y 51 kD.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo puede ser una mezcla de hidroxietil almidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y/o diferentes grados de sustitución y/o diferentes relaciones de sustitución C2: C6. Por lo tanto, pueden emplearse mezclas de hidroxietil almidones que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2: C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma relación de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y diferentes grados de sustitución y diferentes relaciones de sustitución C2:C6, o que tienen diferentes pesos moleculares medios y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y la misma o aproximadamente la misma relación de sustitución C2:C6, o que tienen los mismos o aproximadamente los mismos pesos moleculares medios y diferentes grados de sustitución y la misma o aproximadamente la misma relación de sustitución C2:C6, o que tienen el mismo o aproximadamente el mismo peso molecular medio y el mismo o aproximadamente el mismo grado de sustitución y diferentes relaciones de

sustitución C2: C6, o que tienen aproximadamente el mismo peso molecular medio y aproximadamente el mismo grado de sustitución y aproximadamente la misma relación de sustitución C2:C6.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un ácido polisiálico (PSA) o un derivado del mismo. Los ácidos polisiálicos (PSAs) son polímeros no ramificados de presentación natural de ácido siálico producido por ciertas cepas bacterianas y en mamíferos en ciertas células. Roth J., et al. (1993) en *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza), páginas 335– 348. Pueden producirse en diversos grados de polimerización desde $n \approx$ aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hasta $n=2$ por hidrólisis ácida limitada o por digestión con neuraminidasas, o por fraccionamiento de las formas del polímero naturales, derivadas bacteriamente. La composición de diferentes ácidos polisiálicos también varía de tal manera que existen formas homopoliméricas, es decir, el ácido polisiálico alfa-2,8-ligado que comprende el polisacárido capsular de la cepa KI de *E. coli* y los meningococos del grupo B, que también se encuentra en la forma embrionaria de la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM, por sus siglas en inglés). También existen las formas heteropoliméricas— tales como el ácido alfa-2,8 alfa-2,9 polisiálico alternativo de la cepa K92 de *E. coli* y polisacáridos del grupo C de *N. meningitidis*. También puede encontrarse ácido siálico en copolímeros alternativos con monómeros diferentes al ácido siálico tal como el grupo W 135 o el grupo Y de *N. meningitidis*. Los ácidos polisiálicos tienen funciones biológicas importantes incluyendo la evasión de los sistemas inmunes y complementarios por bacterias patógenas y la regulación de la adhesión glial de neuronas inmaduras durante el desarrollo fetal (donde el

polímero tiene una función antiadhesiva) Cho y Troy, P.N.A.S., USA, 91 (1994) 11427–11431, si bien no existen receptores conocidos para ácidos polisiálicos en mamíferos. El ácido polisiálico alfa–2,8 –ligado de la cepa KI de E. coli es también conocido como 'ácido colomínico' y se utiliza (en diversas longitudes) para ejemplificar la presente invención. Se han descrito diversos métodos para unir o conjugar ácidos polisiálicos a un péptido o polipéptido (por ejemplo, véase la Pat. Estadounidense No. 5.846.951; WO–A–0187922, y US 2007/0191597 A1.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un polímero de homo–aminoácido (HAP, por sus siglas en inglés) rico en glicina. La secuencia de HAP puede comprender una secuencia repetitiva de glicina, la cual tiene por lo menos 50 aminoácidos, por lo menos 100 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos, o 500 aminoácidos de largo. En una realización, la secuencia de HAP es capaz de prolongar la vida media de un resto fusionado a la secuencia de HAP o ligado a la misma. Los ejemplos no limitantes de la secuencia de HAP incluyen, meramente a título enunciativo (Gly) n , (Gly4Ser) n o S(Gly4Ser) n , donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En una realización, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40. En otra realización, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200.

En ciertos aspectos, un compuesto de la invención está unido covalentemente a por lo menos un resto heterólogo que es o comprende un polipéptido XTEN o fragmento, variante, o derivado del mismo. En el presente

contexto "polipéptido XTEN" se refiere a polipéptidos de longitud prolongada con secuencias de presentación no natural, sustancialmente no repetitivas que están compuestas principalmente por aminoácidos hidrófilos pequeños, teniendo la secuencia un bajo grado o ninguna estructura secundaria o terciaria bajo condiciones fisiológicas. Como un resto heterólogo, XTENs pueden servir como un resto de extensión de la vida media. Adicionalmente, XTEN puede proporcionar propiedades deseables incluyendo, meramente a título enunciativo, mejora de los parámetros farmacocinéticos y de las características de solubilidad.

La incorporación de un resto heterólogo que comprende una secuencia de XTEN en un conjugado de la invención puede conferir una o más de las siguientes propiedades ventajosas al conjugado resultante: flexibilidad conformacional, aumento de la solubilidad acuosa, alto grado de resistencia a proteasa, baja inmunogenicidad, baja unión a receptores de mamíferos, o aumento de los radios hidrodinámicos (o Stokes).

En ciertos aspectos, un resto de XTEN puede aumentar las propiedades farmacocinéticas tal como vida media in vivo más larga o aumento del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés), de tal modo que un compuesto o conjugado de la invención permanece in vivo y tiene actividad procoagulante durante un mayor período de tiempo en comparación con un compuesto o conjugado con el mismo pero sin el resto heterólogo de XTEN.

Los ejemplos de restos de XTEN que pueden utilizarse como restos heterólogos en conjugados procoagulantes de la invención son descritos, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos de América

Nos. 2010/0239554 AI, 2010/0323956 AI, 2011/0046060 AI, 2011/0046061 AI, 2011/0077199 AI, o 2011/0172146 AI, o Números de Publicaciones de Patentes Internacionales WO 2010091122 AI, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 AI, WO 2011028228 AI, WO 2011028229 AI, o WO 2011028344 A2.

Dentro del significado de la presente invención, el término “Fc” debe entenderse como región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, tal como una región Fc o un socio de unión a FcRn. En ciertas realizaciones, el compuesto o conjugado está ligado a una o más regiones Fc truncadas las cuales, no obstante, son suficientes para conferir propiedades de unión al receptor Fc (FcR) a la región Fc. Por ejemplo, la porción de una región Fc que se une a FcRn (es decir, la porción de unión a FcRn) comprende entre aproximadamente aminoácidos 282–438 de IgG1, numeración EU (siendo los sitios de contacto primarios los aminoácidos 248, 250–257, 272, 285, 288, 290–291, 308–311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385–387, 428, y 433–436 del dominio CH3. Por consiguiente, una región Fc en un derivado de péptido de ADM biológicamente activo de la invención puede comprender o consistir en una porción de unión a FcRn. Las porciones de unión a FcRn pueden ser derivadas de cadenas pesadas de cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En una realización, se utiliza una porción de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG1. En otra realización, se utiliza una porción de unión a FcRn de un anticuerpo del isotipo humano IgG4.

En ciertas realizaciones, una región Fc comprende por lo menos uno de: un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior) (aproximadamente los aminoácidos 216–230 de una región Fc de anticuerpo de

acuerdo con la numeración EU), un dominio CH2 (aproximadamente los aminoácidos 231– 340 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración EU), un dominio CH3 (aproximadamente los aminoácidos 341–438 de una región Fc de anticuerpo de acuerdo con la numeración EU), un dominio CH4, o una variante, porción, o fragmento del mismo. En otras realizaciones, una región Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3). En algunas realizaciones, una región Fc comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una porción del mismo), un dominio bisagra (o una porción del mismo) fusionado a un dominio CH2 (o una porción del mismo), un dominio CH2 (o una porción del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una porción del mismo), un dominio CH2 (o una porción del mismo) fusionado tanto a un dominio bisagra (o una porción del mismo) como a un dominio CH3 (o una porción del mismo). En aún otras realizaciones, una región Fc carece de por lo menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio CH2). En una realización particular, una región Fc comprende o consiste en los aminoácidos correspondientes a los números EU 221 a 447.

Una Fc en un derivado peptídico de ADM biológicamente activo de la invención puede incluir, por ejemplo, un cambio (por ejemplo, una sustitución) en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas en las Publicaciones PCT Internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2,

WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2; Publ. de Pat. Estadounidenses Nos. US 2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056; o Pat. Estadounidenses Nos. 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; 7.083.784; 7.404.956, y 7.317.091. En una realización, el cambio específico (por ejemplo, la sustitución específica de uno o más aminoácidos descritos en la técnica) puede realizarse en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas. En otra realización, puede realizarse un cambio diferente en una o más de las posiciones de aminoácidos descritas (por ejemplo, la sustitución diferente de una o más posiciones de aminoácidos descritas en la técnica).

Una región Fc utilizada en la invención también puede comprender una sustitución de aminoácidos reconocida en la técnica la cual altera su glicosilación. Por ejemplo, la Fc tiene una mutación que conduce a glicosilación reducida (por ejemplo, glicosilación N- u O-ligada) o puede comprender una glicofoma alterada del resto Fc tipo salvaje (por ejemplo, un glicano bajo en fucosa o libre de fucosa).

En ciertas realizaciones, el compuesto o conjugado de la invención está ligado a un resto heterólogo que comprende albúmina o su fragmento funcional. La seroalbúmina humana (HSA, o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su

forma de longitud completa, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica de suero y también funciona como un portador de ligandos endógenos y exógenos. El término "albúmina" en el presente contexto incluye albúmina de longitud completa o un fragmento, variante, derivado o análogo funcional de la misma. Los ejemplos de albúmina o los fragmentos o variantes de la misma son descritos en las Publ. de Pat. de los Estados Unidos Nos. 2008/0194481A1, 2008/0004206 AI, 2008/0161243 AI, 2008/0261877 AI, o 2008/0153751 AI o Publ. de Solicitudes PCT Nos. 2008/033413 A2, 2009/058322 AI, o 2007/021494 A2.

En una realización, el resto heterólogo es albúmina, un fragmento, o una variante de la misma el cual está ligado adicionalmente a un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina o porción de la misma (por ejemplo, una región Fc), una secuencia de PAS, HES, y PEG.

En ciertas realizaciones, el resto heterólogo es un resto de unión a albúmina, el cual comprende un péptido de unión a albúmina, un dominio de unión a albúmina bacteriana, un fragmento de anticuerpo de unión a albúmina, o cualquiera de sus combinaciones.

Por ejemplo, la proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye anticuerpos de dominio (véase la Pat. Estadounidense No. 6.696.245). Una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, puede ser un dominio de unión a albúmina bacteriana, tal como el de la proteína G estreptocócica G (Konig, T. y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73–83). Otros ejemplos de péptidos

de unión a albúmina que se pueden utilizar como socio de conjugación son, por ejemplo, aquellos que tienen una secuencia de consenso Cys–Xaa i –Xaa 2 –Xaa 3–Xaa 4 –Cys, donde Xaa i es Asp, Asn, Ser, Thr, o Trp; Xaa 2 es Asn, Gin, H es, He, Leu, o Lys; Xaa 3 es Ala, Asp, Phe, Trp, o Tyr; y Xaa 4 es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, o Thr según lo descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos 2003/0069395 o Dennis et al. (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035–35043). El dominio 3 de la proteína G estreptocócica, según lo descrito por Kraulis et al, FEBS Lett. 378: 190–194 (1996) y Linhult et al, Protein Sci. 11:206–213 (2002) es un ejemplo de un dominio de unión a albúmina bacteriana. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia núcleo DICLPRWGCLW (SEC ID NO:45). Véase, por ejemplo, Dennis et al, J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035–35043 (2002). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a albúmina son descritos en Muller y Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319–326 (2007); Roovers et al, Cancer Immunol. Immunother. 56:303–317 (2007), y Holt et al, Prot. Eng. Design Sci., 21:283–288 (2008), los cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. Un ejemplo de dicho resto de unión a albúmina es 2–(3–maleimidopropanamido)–6–(4–(4–yodofenil)butanamido) hexanoato (etiqueta "Albu") según lo descrito por Trusselet et al, Bioconjugate Chem. 20:2286–2292 (2009).

De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son según lo definido de la siguiente manera:

Z está ausente y X^1 , X^2 , y X^3 son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal

de los mismos.

De acuerdo con esta realización, el resto heterólogo X^3 según lo definido anteriormente está ligado covalentemente a X^2 en forma permanente. Dentro del significado de la presente invención, el término que un resto está “ligado covalentemente al péptido en forma permanente” debe entenderse, que el resto está ligado covalentemente al péptido sin utilizar un ligante Z. Un ejemplo es la funcionalización del extremo terminal N o funcionalidades de cadena lateral adecuadas de cualquier aminoácido en la secuencia del péptido de fórmula (I) con un ácido carboxílico C_3-C_{100} lineal o ramificado, preferentemente un ácido carboxílico C_4-C_{30} , opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, o fosfato, y el cual puede estar saturado, o mono- o di-insaturado.

De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son definidos de la siguiente manera:

Z es un ligante escindible según lo definido anteriormente; y X^1 , X^2 , y X^3 son según lo definido anteriormente;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

Dentro del significado de la presente invención, el término “ligante escindible” debe entenderse como un ligante entre X^2 y X^3 , el cual hace posible que el resto heterólogo sea liberado de X^2 mediante un proceso enzimático o mediante un proceso nucleófilo dependiente del pH o mediante hidrólisis o mediante cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con una realización de la presente invención, los compuestos de fórmula (I) son adicionalmente modificados mediante N–metilación de por lo menos un enlace amida.

La influencia de N–metilación sobre la estabilidad metabólica de los péptidos ha sido descrita para diversos péptidos. Por ejemplo, la ciclosporina es un péptido N–metilado varias veces, cíclico, de presentación natural que exhibe un excelente perfil farmacocinético. La N–metilación, en general, bloquea la degradación enzimática por proteasas ya que son incapaces de escindir enlaces peptídicos N–metilados. Se ha demostrado que la N–metilación múltiple mejora la estabilidad metabólica y la permeabilidad intestinal de los péptidos [Chatterjee J, Gilon C, Hoffman A, Kessler H, *N–methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry*, *Acc Chem Res.*, **41**(10), 1331–1342, **2008**]. Se utilizó ciclación combinada con N–metilación para modular las propiedades fisicoquímicas de los péptidos, incluyendo la estabilidad metabólica, permeabilidad de membrana y biodisponibilidad oral [Chatterjee J, Laufer B, Kessler H, *Synthesis of N–methylated cyclic peptides*, *Nat Protoc.*, **7**(3), 432–444, **2012**]. Dong QG, Zhang Y, Wang MS, Feng J, Zhang HH, Wu YG, Gu TJ, Yu XH, Jiang CL, Chen Y, Li W, Kong W, *Improvement of enzymatic stability and intestinal permeability of deuterohemin–peptide conjugates by specific multi–site N–methylation*, *Amino Acids.*, **43**(6), 2431–2441, **2012**, describen que la N–Metilación en sitios seleccionados mostró resistencia elevada contra la degradación proteolítica. En la preparación intestinal y suero diluido se observaron valores de vida media 50 a 140 veces más altos. Sin embargo, Linde Y, Ovadia O, Safrai E, Xiang Z, Portillo FP, Shalev DE, Haskell–Luevano C, Hoffman A, Gilon C, *Structure–activity relationship and metabolic stability studies*

of backbone cyclization and *N*-methylation of melanocortin peptides, *Biopolymers.*, 90(5), 671–682, **2008**, describen que los análogos *N*-metilados cíclicos de la hormona estimuladora de α -melanocitos eran más estables, sin embargo, menos biológicamente activos que el péptido progenitor.

Los compuestos de acuerdo con la invención exhiben un espectro imprevisiblemente útil de actividad farmacológica.

Por consiguiente, los mismos son adecuados para utilizar como medicamentos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades en seres humanos y animales.

La presente invención provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o prevención de trastornos, especialmente de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.

Para la presente invención, el término "tratamiento" o "tratar" incluye inhibir, retardar, aliviar, mitigar, detener, reducir o causar la regresión de una enfermedad, trastorno, afección, o estado, su desarrollo y/o progresión, y/o sus síntomas. El término "prevención" o "prevenir" incluye reducir el riesgo de padecer, contraer o experimentar una enfermedad, trastorno, afección, o estado, su desarrollo y/o progresión, y/o sus síntomas. El término prevención incluye profilaxis. El tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno, afección, o estado puede ser parcial o completo.

Sobre la base de sus propiedades farmacológicas, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser empleados para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares, en particular insuficiencia

cardíaca, especialmente insuficiencia cardíaca crónica y aguda, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica y sistólica (congestiva), insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, infarto de miocardio, lesión por isquemia–reperfusión, accidente cerebrovascular isquémico y hemorrágico, arteriosclerosis, aterosclerosis, hipertensión, especialmente hipertensión esencial, hipertensión esencial maligna, hipertensión secundaria, hipertensión renovascular e hipertensión secundaria a trastornos renales y endocrinos, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad renal hipertensiva, hipertensión pulmonar, especialmente hipertensión pulmonar secundaria, hipertensión pulmonar luego de embolia pulmonar con y sin cor pulmonale agudo, hipertensión pulmonar primaria y enfermedad oclusiva arterial periférica.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de edema gestacional [inducida por el embarazo] edema y proteinuria con y sin hipertensión (pre-eclampsia).

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de trastornos pulmonares, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y crónico, alveolitis alérgica y neumonitis debido a la inhalación de partículas y polvo orgánico de origen fúngico, actinomicético u otro origen, bronquitis química aguda, edema pulmonar químico agudo y crónico (por ejemplo, después de inhalación de fosgeno, óxido de nitrógeno), edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y crónicas debidas a radiación, trastornos pulmonares intersticiales agudos y crónicos (tales como, entre otros, trastornos

pulmonares intersticiales inducidos por fármacos, por ejemplo, secundarios al tratamiento con Bleomicina), daño pulmonar agudo/síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS, por sus siglas en inglés) en adulto o niño incluyendo en el recién nacido, ALI/ARDS secundario a neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS secundario a aspiración (tal como, entre otros, neumonía por aspiración a causa de contenido gástrico regurgitado), ALI/ARDS secundario a inhalación de gas de humo, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI, por sus siglas en inglés), ALI/ARDS o insuficiencia pulmonar aguda luego de cirugía, traumatismo o quemaduras, lesión pulmonar inducida por ventilador (VILI, por sus siglas en inglés), lesión pulmonar luego de aspiración de meconio, fibrosis pulmonar, y mal de montaña.

Los compuestos de acuerdo con la invención son adicionalmente adecuados para el tratamiento y/o prevención de enfermedades renales crónicas (etapas 1–5), insuficiencia renal, nefropatía diabética, enfermedad renal crónica hipertensiva, glomerulonefritis, síndrome nefrítico rápidamente progresivo y crónico, síndrome nefrítico no específico, síndrome nefrótico, nefropatías hereditarias, nefritis tubulo–intersticial aguda y crónica, lesión renal aguda, insuficiencia renal postraumática, lesión renal traumática y después de realizar un procedimiento, síndrome cardiorrenal, y protección y mejora funcional de trasplantes renales.

Adicionalmente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o prevención de diabetes mellitus y sus síntomas consecutivos, tales como por ejemplo, macro– y microangiopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser

utilizados para el tratamiento y/o prevención de trastornos del sistema nervioso central y periférico tal como meningitis viral y bacteriana y encefalitis (por ejemplo, encefalitis por virus varicela Zoster), lesión cerebral traumática y tóxica, neoplasma maligno primario o secundario [metástasis] del cerebro y de la médula espinal, radiculitis y polirradiculitis, síndrome de Guillain–Barre [polineuritis aguda (pos)infección, Síndrome de Miller Fisher], esclerosis lateral amiotrófica [atrofia progresiva de la musculatura espinal], enfermedad de Parkinson', polineuropatías agudas y crónicas, dolor, edema cerebral, mal de Alzheimer, enfermedades degenerativas del sistema nervioso y enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central tal como, meramente a título enunciativo, esclerosis múltiple.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de hipertensión portal y fibrosis hepática [cirrosis] y de sus secuelas tales como las várices esofágicas y ascitis, para el tratamiento y/o prevención de efusiones pleurales secundarias a enfermedades malignas o inflamaciones y para el tratamiento y/o prevención de linfedema y de edema secundario a várices.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de trastornos inflamatorios del tracto gastrointestinal tal como enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, y trastornos tóxicos y vasculares del intestino.

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento y/o prevención de sepsis, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) de

origen no infeccioso, choque hemorrágico, sepsis o SIRS con disfunción orgánica o falla multiorgánica (MOF, por sus siglas en inglés), choque traumático, choque tóxico, choque anafiláctico, urticaria, alergias relacionadas con picadura de insectos, edema angioneurótico [urticaria Giant (angioedema), edema de Quincke], laringitis aguda y traqueítis, y laringitis obstructiva aguda [crup] y epiglottitis.

Adicionalmente, los compuesto son adecuados para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del tipo reumáticas y otras formas de enfermedad que se toman como enfermedades autoinmunes tales como, entre otras, poliartritis, lupus eritematoso, esclerodermia, púrpura y vasculitis.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento de trastornos oculares edematosos o trastornos oculares asociados con función vascular alterada, incluyendo, meramente a título enunciativo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés), retinopatía diabética, en particular edema macular diabético (DME, por sus siglas en inglés), edema subretiniano, y edema intrarretiniano. En el contexto de la presente invención, el término degeneración macular relacionada con la edad (AMD) abarca tanto a las manifestaciones húmedas (o exudativas, neovasculares) como secas (o no exudativas, no neovasculares) de AMD.

Además, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento de la hipertensión ocular (glaucoma).

Adicionalmente, los compuestos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de estados relacionados con

operaciones de isquemia y sus síntomas consecutivos después de intervenciones quirúrgicas, en particular intervenciones cardíacas utilizando una máquina cardio–pulmonar (por ejemplo, operaciones de bypass (derivación), implantes de válvula cardíaca), intervenciones en las arterias carótidas, intervenciones en la aorta e intervenciones con apertura o penetración instrumental de la corteza ósea.

Adicionalmente, los compuestos son adecuados para el tratamiento general y/o prevención en caso de intervenciones quirúrgicas con el objetivo de acelerar la curación de heridas y acortamiento del tiempo de convalecencia. Además son adecuados para la promoción de la curación de heridas.

Adicionalmente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o prevención de trastornos de la densidad y estructura ósea tales como, entre otros, osteoporosis, osteomalacia y trastornos óseos relacionados con hiperparatiroidismo.

Adicionalmente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o prevención de disfunciones sexuales, en particular en la disfunción eréctil masculina.

Preferentemente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o prevención de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca diastólica y sistólica (congestiva), enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular isquémico y hemorrágico, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad

oclusiva arterial periférica, pre-eclampsia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y/o crónico, alveolitis alérgica y/o neumonitis debido a inhalación de polvo orgánico y partículas de origen fúngico, actinomicético o de otro origen, y/o bronquitis química aguda, edema pulmonar químico agudo y/o crónico, edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y/o crónicas debidas a radiación, trastornos pulmonares intersticiales agudos y/o crónicos, daño pulmonar agudo/ síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS) en adulto o niño incluyendo el recién nacido, ALI/ARDS secundario a neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS secundario a aspiración, ALI/ARDS secundario a inhalación por gas de humo, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión– (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda luego de cirugía, traumatismo y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por ventilador (VILI), lesión pulmonar luego de aspiración de meconio, fibrosis pulmonar, enfermedad de montaña, enfermedades renales crónicas, glomerulonefritis, lesión renal aguda, síndrome cardiorrenal, linfedema, enfermedad intestinal inflamatoria, sepsis, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, choque anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria y/o urticaria.

Más preferentemente, los compuestos son adecuados para el tratamiento y/o prevención de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca descompensada aguda, insuficiencia cardíaca diastólica y sistólica (congestiva), hipertensión, hipertensión pulmonar, asma, edema pulmonar químico agudo y/o crónico, lesión pulmonar aguda/ síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS) en adulto o niño incluyendo en el

recién nacido, ALI/ARDS secundario a neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS secundario a aspiración, ALI/ARDS secundario a inhalación de gas de humo, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda luego de cirugía, traumatismo y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por ventilador (VILI), lesión pulmonar luego de aspiración de meconio, sepsis, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, choque anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria y/o urticaria.

La presente invención provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o prevención de trastornos, en particular de los trastornos antes mencionados.

La presente invención provee además el uso de los compuestos de acuerdo con la invención para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, en particular los trastornos antes mencionados.

La presente invención provee además un método para el tratamiento y/o prevención de trastornos, en particular los trastornos antes mencionados, utilizando una cantidad activa de los compuestos de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además medicamentos que comprenden un compuesto de acuerdo con la invención y uno o más ingredientes activos adicionales, en particular para el tratamiento y/o prevención de los trastornos antes mencionados. Las combinaciones ejemplares y preferidas de ingredientes activos son:

Inhibidores de ACE, antagonistas de los receptores de la angiotensina,

agonistas de receptores beta-2, inhibidores de la fosfodiesterasa, agonistas de los receptores glucocorticoides, diuréticos, o enzima 2 de conversión de angiotensina recombinante o ácido acetilsalicílico (aspirina).

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con un inhibidor de ACE, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, enalapril, quinapril, captopril, lisinopril, ramipril, delapril, fosinopril, perindopril, cilazapril, imidapril, benazepril, moexipril, espirapril o trandopril.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con un antagonista de receptor de angiotensina, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, losartan, candesartan, valsartan, telmisartan o embusartan.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con un agonista de los receptores beta-2, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, salbutamol, pirbuterol, salmeterol, terbutalina, fenoterol, tulobuterol, clenbuterol, reproterol o formoterol.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE, por sus siglas en inglés), tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, milrinona, amrinona, pimobendan, cilostazol, sildenafil, vardenafil o tadalafil.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo

con la invención son administrados en combinación con un agonista de los receptores glucocorticoides, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, cortisol, cortisona, hidrocortisona, prednisona, metil-prednisolona, prednilideno, deflazacort, fluocortolona, triamcinolona, dexametasona o betametasona.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con diuréticos, tales como, a modo de ejemplo y preferentemente, furosemida, torasemida e hidroclorotiazida.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con péptidos natriuréticos, tales como nesiritide (péptido natriurético tipo B humano (hBNP, por sus siglas en inglés)) y carperitide (polipéptido natriurético atrial humano alfa (hANP, por sus siglas en inglés)).

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con urodilatina, un derivado de ANP aún en proceso de desarrollo para la insuficiencia cardíaca aguda.

En una realización preferida de la invención, los compuestos de acuerdo con la invención son administrados en combinación con LCZ696 (Entresto), un inhibidor de neprilisina (encefalinasa, endopeptidasa neutra, NEP, también involucrada en el metabolismo de ADM).

La presente invención se refiere además a medicamentos los cuales comprenden por lo menos un compuesto de acuerdo con la invención, normalmente junto con uno o más excipientes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados y se refiere a su utilización para los propósitos

antes mencionados.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden actuar sistémica y/o localmente. Con este fin, los mismos se pueden administrar en forma adecuada, por ejemplo por vía parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, dérmica, transdérmica, de la conjuntiva, óptica o como implante o endoprótesis vascular (stent).

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser administrados en formas de administración adecuadas para estas vías de administración.

La administración parenteral puede tener lugar evitando una etapa de absorción (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intraespinal o intralumbar) o con inclusión de una absorción (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de administración adecuadas para la administración parenteral incluyen preparaciones para inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

Las otras vías de administración adecuadas son, por ejemplo, las formas farmacéuticas para inhalación (incluyendo los inhaladores de polvo, nebulizadores), gotas nasales, gotas oculares, soluciones o pulverizaciones; películas/obleas o suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitar), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, sistemas terapéuticos transdérmicos (por ejemplo, parches), leche, pastas, espumas, polvos para espolvorear, implantes o stents.

Se prefiere la administración parenteral, especialmente la administración

intravenosa. Se prefiere además la administración inhalativa, por ejemplo, utilizando inhaladores de polvo o nebulizadores.

Los compuestos de acuerdo con la invención son convertidos en las formas indicadas de administración. Esto puede tener lugar en forma conocida per se mezclando con excipientes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente adecuados. Estos excipientes incluyen portadores (por ejemplo celulosa microcristalina, lactosa, manitol), solventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes y dispersantes o agentes humectantes (por ejemplo dodecilsulfato sódico, oleato de polioxisorbitán), aglutinantes (por ejemplo polivinilpirrolidona), polímeros sintéticos y naturales (por ejemplo albúmina), estabilizadores (por ejemplo, antioxidantes, por ejemplo ácido ascórbico), colores (por ejemplo, pigmentos inorgánicos, por ejemplo óxidos de hierro) y saborizantes y/u olores de enmascaramiento.

En general, se ha encontrado ventajoso, en el caso de la administración parenteral, administrar cantidades de aproximadamente 0,001 a 5 mg/kg, preferentemente aproximadamente 0,01 a 1 mg/kg, de peso corporal para lograr resultados eficaces.

No obstante, puede ser necesario, en algunos casos, desviarse de las cantidades indicadas; en particular en función del peso corporal, la vía de administración, la respuesta individual al ingrediente activo, la naturaleza de la preparación y el tiempo o intervalo en que tiene lugar la administración.

Por ejemplo, puede ser suficiente, en algunos casos, la cantidad mínima antes mencionada, mientras que en otros casos deberá excederse el límite

superior indicado. En el caso de la administración de cantidades más grandes, puede ser recomendable dividir las en una pluralidad de dosis individuales durante el día.

Los siguientes ejemplos de trabajo ilustran la invención. La invención no queda limitada a los ejemplos.

Los porcentajes en los ensayos que siguen y en los ejemplos son, a menos que se indique lo contrario, porcentajes en peso; las partes son partes en peso. Las relaciones de solventes, relaciones de dilución y datos de concentraciones para las soluciones líquido/ líquido se basan, cada uno, en el volumen.

Explicación de las Figuras:

Fig. 1: Ensayos de resistencia eléctrica transcelular en células endoteliales (1b). El tratamiento con el Ejemplo 16 redujo la falla de la resistencia eléctrica de una monocapa de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) después de la estimulación con dosis de trombina en forma dependiente y significativa en concentraciones de ≥ 1 nmol/L. Se graficaron los valores como medias $\pm$ SEM de 4 puntos de datos.

Fig. 2: Ensayos de permeabilidad in vitro en células endoteliales (1c). El tratamiento con el Ejemplo 18 redujo la permeabilidad de una monocapa HUVEC para FITC-Dextrano luego de la estimulación con dosis de trombina en forma dependiente y significativa en concentraciones de $\geq 0,3$ nmol/L. Se graficaron los

valores como medias $\pm$ SEM de por lo menos 4 puntos de datos.

Fig. 3: Estabilidad de péptidos en plasma calculada con GraphPad Prism 5 (Programa Informático GraphPad) utilizando análisis de caída de dos fases para la determinación de la vida media (lento) (Ensayo 1e). Análogos marcados con 6-carboxitetrametilrodamina-(TAM) en extremos N-terminales de Control: TAM[G¹⁴]ADM(14–52); Ejemplo 18: TAM[K¹⁴(PAM), (Dpr¹⁶, E²¹)lac]ADM(14–52); y Ejemplo 27: TAM[K¹⁴(PAM), (Dpr¹⁶, E²¹)lac, N_α-Me-K⁴⁶]ADM(14–52).

Fig. 4: Ensayo de transmigración de granulocitos (Ensayo 1f). El tratamiento con el Ejemplo 18 redujo la transmigración de PMNS a través de HUVECs estimuladas con TNF- α significativamente en concentraciones de $1 \geq$ nmol/L. Se graficaron los valores como medias $\pm$ SEM de 7 replicaciones, control vehículo n=12. El anticuerpo anti ICAM-1 sirvió como control positivo, n=6.

Fig. 5: Medición de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca en ratas Wistar, normotensas, con monitorización por telemetría. (Ensayo 2a) Perfiles de 24 horas de la presión sanguínea arterial media (MABP, por sus siglas en inglés) registrada de ratas Wistar, hembras, normotensas, monitorizadas por telemetría después de la administración subcutánea del ejemplo 18 o vehículo en dosis según lo indicado (línea de puntos). Se graficaron los puntos de datos como medias $\pm$ SEM de intervalos de 30 min. promediados de 6 animales por grupo. La administración del Ejemplo 18 en una dosis de 100 μ g/kg redujo la MABP en aproximadamente 20 a 25 % hasta 3,5 h luego de la administración (círculos negros). Entre 4 h y 8 h después de la administración, la MABP retornó gradualmente a los valores iniciales y finalmente estaba en el rango de los animales tratados con vehículo.

La adrenomedulina del tipo salvaje (Bachem, H-2932) induce una reducción de la presión sanguínea en este ensayo con duración de ≤ 4 h cuando se ensaya con dosis de ≤ 300 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (referencia WO 2013/064508 A1, Fig. 1). Las sustancias de acuerdo con la presente invención indujeron una reducción de la presión sanguínea de hasta 8 h con dosis de ≤ 200 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (como se hace referencia al componente peptídico).

A. Ejemplos

Análogos de Adrenomedulina

Abreviaturas

AA	aminoácido
ACN	acetonitrilo
AcOH	ácido acético
ADM	adrenomedulina (humana)
All	alilo
Alloc	aliloxycarbonilo
aprox.	aproximadamente
Boc	<i>tert</i> -butiloxycarbonilo
$\text{C}^{16} \rightarrow \text{U}^{21} / \text{U}^{16} \rightarrow \text{C}^{21}$	cistationina
Dab	ácido 2,4-diaminobutírico
DCM	diclorometano
Dde	<i>N</i> - γ -(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo
DDTC	dietilditiocarbamato sódico
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropildietilamina

DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Dpr	ácido <i>N</i> -β-4-metiltritol-L-diaminopropiónico
EDT	etano-1,2-ditiol
eq.	equivalente(s)
ESI	ionización por electropulverización (en EM)
Fmoc	<i>N</i> -[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonilo
HCl	ácido clorhídrico
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento, presión elevada
ivDde	<i>N</i> -γ-1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
MALDI	desorción/ionización láser asistida por matriz (en EM)
Mmt	Metoxitritilo
EM	espectrometría de masas
Mtt	Metiltritilo
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
<i>N</i> -Me	<i>N</i> -metilo
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
OPp	2-fenilisopropilo
Oxyma	2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo
PAM	ácido palmítico

Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
RP	fase inversa (en HPLC)
TA	tioanisol
TBST	solución salina tamponada con tris /Tween® 20
tBu	<i>terc</i> -butilo
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
TPP-Pd	tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0)
Trt	tritilo
U ¹⁶ →U ²¹	ácido 2,7-diaminosubérico
v/v	<i>volumen/volumen</i>

La nomenclatura de aminoácidos y secuencias peptídicas es de acuerdo con:

International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry: Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y Unión Internacional de Bioquímica: Nomenclatura y Simbolismo para Aminoácidos y Péptidos) (Recomendaciones 1983). En: Pure & Appl. Chem. 56, Vol. 5, 1984, p. 595–624

Nombre Trivial	Símbolo	Símbolo de una
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R

Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Lista de Ejemplos:

Ejemplo	Código	Secuencia
1	$[G^{14}, (E^{16}, K^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGE+RFGTK+TVQKLAHQIQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
2	$[G^{14}, (K^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGK+RFGTE+TVQKLAHQIQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
3	$[G^{14}, (Dpr^{16}, D^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGDpr+RFGTD+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
4	$[G^{14}, (D^{16}, Dab^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGD+RFGTDab+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
5	$[G^{14}, (Dab^{16}, D^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGDab+RFGTD+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
6	$[G^{14}, (E^{16}, Dpr^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGE+RFGTDpr+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
7	$[G^{14}, (Dpr^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGDpr+RFGTE+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂

8	$[G^{14}, (D^{16}, Orn^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGD+RFGTOm+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
9	$[G^{14}, (Orn^{16}, D^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGOrn+RFGTD+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
10	$[G^{14}, (E^{16}, Dab^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGE+RFGTDab+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
11	$[G^{14}, (Dab^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGDab+RFGTE+TVQKLAHQIQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
12	$[K^{14}(PAM), (E^{16}, K^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- K(PAM)GE+RFGTK+TVQKLAHQIQFTDKD KDNVAPRSKISPQGY-NH ₂
13	$[K^{14}(PAM), (K^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- K(PAM)GK+RFGTE+TVQKLAHQIQFTDKD KDNVAPRSKISPQGY-NH ₂
14	$[K^{14}(PAM), (E^{16}, K^{21})_{lac}, N-Me-I^{47}]$ ADM(14-52)	H- K(PAM)GE+RFGTK+TVQKLAHQIQFTDKD KDNVAPRSK-(N-Me)I-SPQGY-NH ₂
15	$[G^{14}, (C^{16} \rightarrow U^{21})]ADM(14-52)$	H- GGC*RFGTU*TVQKLAHQIQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
16	$[G^{14}, (U^{16} \rightarrow C^{21})]ADM(14-52)$	H- GGU*RFGTC*TVQKLAHQIQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
17	$[G^{14}, (U^{16} \rightarrow U^{21})]ADM(14-52)$	H- GGU*RFGTU*TVQKLAHQIQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
18	$[K^{14}(PAM), (Dpr^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	K(PAM)GDpr+RFGTE+TVQKLAHQIQFTD KDKDNVAPRSKISPQGY-NH ₂ (sal acetato)

19	$[G^{14}, (E^{16}, Orn^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGE+RFGTOm+TVQKLAHQIYQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
20	$[G^{14}, (Orn^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGOm+RFGTE+TVQKLAHQIYQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
21	$[G^{14}, (K^{16}, D^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGK+RFGTD+TVQKLAHQIYQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
22	$[G^{14}, (D^{16}, K^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGD+RFGTK+TVQKLAHQIYQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
23	PAM $[G^{14}, (C^{16} \rightarrow U^{21})]ADM(14-52)$	PAM- GGC*RFGTU*TVQKLAHQIYQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
24	PAM $[K^{14}, (C^{16} \rightarrow U^{21})]ADM(14-52)$	PAM- KGC*RFGTU*TVQKLAHQIYQFTDKDKDNV APRSKISPQGY-NH ₂
25	$[K^{14}(PAM), (C^{16} \rightarrow U^{21})]ADM(14-52)$	H- K(PAM)GC*RFGTU*TVQKLAHQIYQFTDKD KDNVAPRSKISPQGY-NH ₂
26	$[G^{14}, (D^{16}, Dpr^{21})_{lac}]ADM(14-52)$	H- GGD+RFGTDpr+TVQKLAHQIYQFTDKDKD NVAPRSKISPQGY-NH ₂
27	$[K14(PAM), (Dpr16, E21)_{lac}, N-Me-K46]ADM(14-52)$	H- K(PAM)GDpr+RFGTE+TVQKLAHQIYQFTD KDKDNVAPRS-(N-Me)K-ISPQGY-NH ₂

- los aminoácidos entre corchetes separados con comas (...) _{lac} indican un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos correspondientes 16 y 21

- los aminoácidos entre corchetes separados con flechas (...→...) indican la incorporación de un mimético de enlace disulfuro de los aminoácidos correspondientes 16 y 21;
- (PAM) indica la unión del ácido palmítico a la cadena lateral del aminoácido correspondiente
- PAM– indica la unión de ácido palmítico al extremo N-terminal del péptido

Métodos

Información general:

Todas las reacciones y procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después de cada etapa de acoplamiento y desprotección, se lavaron las resinas con solvente para eliminar el exceso de reactivos.

Método general para la síntesis de péptidos:

Se sintetizaron análogos de ADM por etapas en una resina NovaSyn®TGR R (Novabiochem) con un sintetizador de péptidos automático (SYRO I, MultiSynTech). Se cargaron los recipientes de reacción con 15 µmol de resina NovaSyn®TGR R. Cada aminoácido y los reactivos Oxyma y DIC se agregaron en un exceso molar de 8 veces (120 µmol). Si no se indica lo contrario, los aminoácidos se protegieron con *N*-α-Fmoc; se utilizaron los grupos protectores indicados más adelante para las funcionalidades de las cadenas laterales. Todas las reacciones se llevaron a cabo en DMF. Se realizó cada etapa de acoplamiento dos veces con un tiempo de reacción de 40 min. Se logró la escisión del grupo protector Fmoc utilizando 40 % de piperidina en DMF (v/v) durante 3 min y piperidina al 20% en DMF (v/v) durante 10 min después de cada etapa de acoplamiento.

Análogos de Adrenomedulina con puente de lactama Ejemplos 1 y 2

2

Síntesis:

Se sintetizaron los ejemplos **1** y **2** usando el método general descrito anteriormente.

Las secuencias de acoplamiento eran las siguientes:

Ciclo de Acoplamiento	Ejemplo 1	Ejemplo 2	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	Gly	51
3.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	50
4.	Pro	Pro	49
5.	Ser(tBu)	Ser(tBu)	48
6.	Ile	Ile	47
7.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	46
8.	Ser(tBu)	Ser(tBu)	45
9.	Arg(Pbf)	Arg(Pbf)	44
10.	Pro	Pro	43
11.	Ala	Ala	42
12.	Val	Val	41
13.	Asn(Trt)	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	37
17.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	36

18.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	35
19.	Thr(tBu)	Thr(tBu)	34
20.	Phe	Phe	33
21.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	32
22.	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	Ile	30
24.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	His(Trt)	28
26.	Ala	Ala	27
27.	Leu	Leu	26
28.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	24
30.	Val	Val	23
31.	Thr(tBu)	Thr(tBu)	22
32.	Lys(Mmt)	Glu(OPp)	21
33.	Thr(tBu)	Thr(tBu)	20
34.	Gly	Gly	19
35.	Phe	Phe	18
36.	Arg(Pbf)	Arg(Pbf)	17
37.		Lys(Mmt)	16
38.		Gly	15

Después de la síntesis automática de la secuencia ADM(15–52), para el ejemplo **1** se acoplaron los aminoácidos Fmoc–Glu(OPp) (AA 16) y Fmoc–Gly–

OH (AA 15) así como también el aminoácido N-terminal Boc-Gly-OH para los ejemplos **1** y **2** manualmente con HOBt y DIC en 5 veces el exceso molar. Se llevó a cabo la reacción en DMF como solvente durante 24 h.

Se logró la remoción de los grupos protectores OPp y Mmt mediante tratamiento de la resina (20 x 2 min) con un cóctel de escisión que consiste en TFA/TIS/DCM (1:5:94, v/v/v). Posteriormente, se lavó la resina (2 x 5 min) con 5 % de DIPEA en DMF.

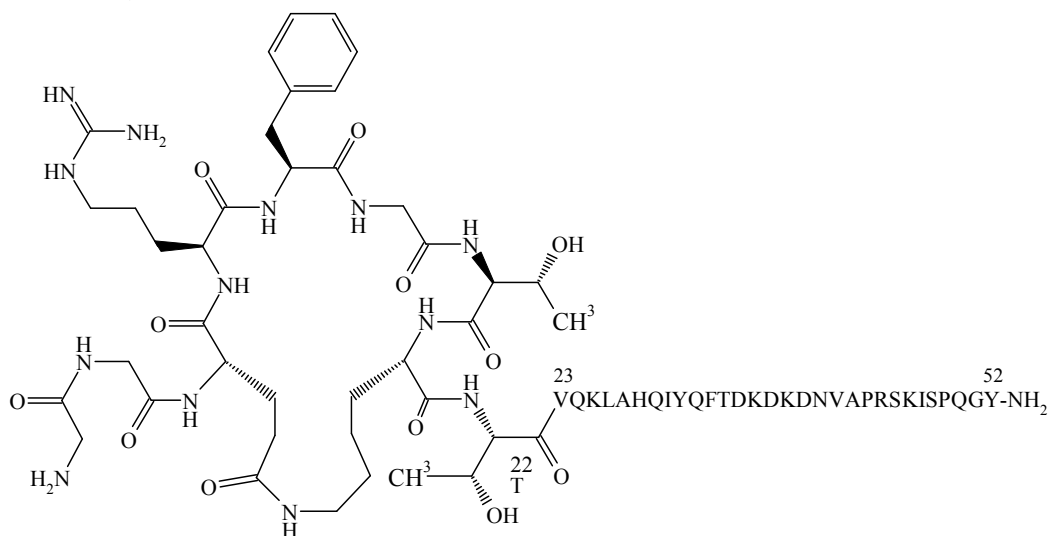
Se introdujo el puente de lactama mediante formación de un enlace amida entre las cadenas laterales de AA 16 y AA 21. Se llevó a cabo la reacción utilizando un exceso de 10 veces (150 μ mol) de HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales se logró con TFA/TIS/H₂O (90:3,5:3,5, v/v/v) durante 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo, y posteriormente se liofilizaron.

Se llevó a cabo la purificación de los péptidos crudos utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (Phenomenex Jupiter 10u Proteo 90 Å: 250 mm x 21,2 mm, 10 μ m, 90 Å). Se aplicó un gradiente lineal de 10 % a 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1 % en agua; Eluyente B = TFA al 0,08 % en ACN). La velocidad de flujo fue de 10 mL/min, se midió la detección de UV a λ = 220 nm.

Ensayos Analíticos:

Se confirmó la identidad de los péptidos por medio de RP-HPLC, MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker) analíticos. Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 1: [G¹⁴, (E¹⁶,K²¹)_{lac}]ADM(14–52)

((2S,5S,11S,14S,23S)–23–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–
bencil–2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,20,24–hexaoxo–
1,4,7,10,13,19–hexaazaciclotetracosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: C₁₉₅H₃₀₆N₅₈O₅₈

Masa Exacta: 4388,278 Da

Peso Molecular: 4390,94 g/mol

Se sintetizó el ejemplo 1 en una escala de 15 µmol. El rendimiento fue de 6,0 mg (9,0 % de teoría).

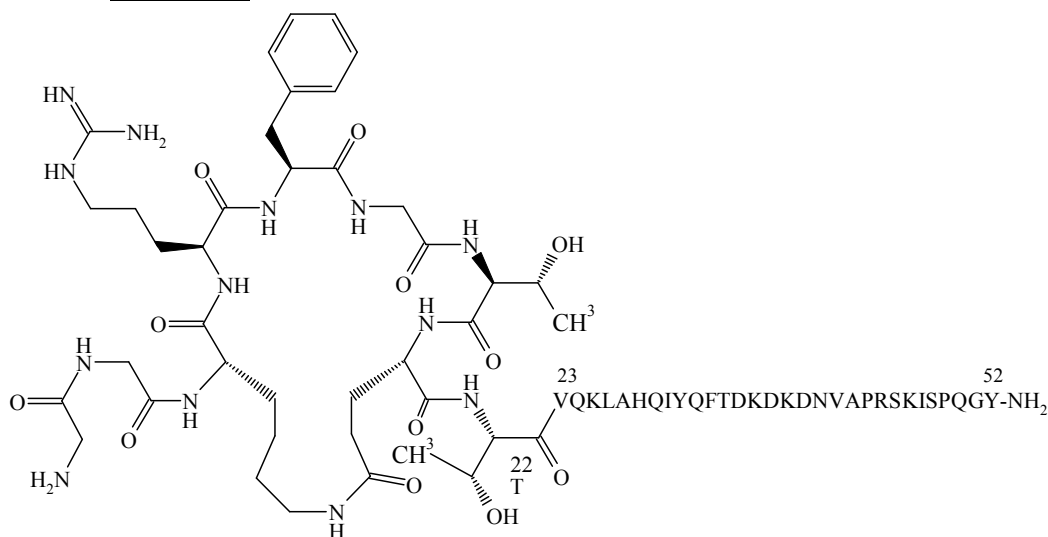
Se analizó el ejemplo 1 mediante RP–HPLC analítica utilizando una columna Jupiter 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å) aplicando un gradiente lineal de 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min. R_t = 30,4 min, pureza ≥ 90 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter ® 4µm Proteo90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del

10 % al 100 % de eluyente B en A durante 60 min (Eluyente A = TFA al 0,1 % en agua; Eluyente B = TFA al 0,08 % en ACN; una velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 21,7 min, pureza $\geq$ 90 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1098,5 $[M+4H]^{4+}$, 879,1 $[M+5H]^{5+}$, 732,8 $[M+6H]^{6+}$, 628,4 $[M+7H]^{7+}$, 550,1 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4389,4 $[M+H]^+$, 2195,1 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 2: $[G^{14}, (K^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,23S)-23-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,17,24-hexaoxo-1,4,7,10,13,18-hexaazaciclotetracosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{195}H_{306}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4388,278 Da

Peso Molecular: 4390,94 g/mol

Se sintetizó el ejemplo **2** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 3,8 mg (5,8 % de teoría)

Se analizó el ejemplo **2** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal de 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo de 0,6 mL/min. R_t = 30,1 min, pureza $\geq$ 90 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Kinetex® 5 μ m XB-C18 (Phenomenex, 250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å), aplicando un gradiente lineal de 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 1,25 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 23,0 min, pureza $\geq$ 90 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1098,5 $[M+4H]^{4+}$, 879,1 $[M+5H]^{5+}$, 732,8 $[M+6H]^{6+}$, 628,4 $[M+7H]^{7+}$, 547,9 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4389,4 $[M+H]^+$, 2195,0 $[M+2H]^{2+}$, 1464,0 $[M+3H]^{3+}$.

Análogos de Adrenomedulina con puente de lactama Ejemplos 3–11, 19–22, y 26

Síntesis:

Se llevaron a cabo las síntesis de los Ejemplos **3–8, 10, 11, y 19–22** utilizando síntesis de péptidos automática de la secuencia ADM(22–52) según lo descrito en el método general. Posteriormente, se incorporaron manualmente las posiciones 21 a 14. Se sintetizaron las secuencias $[G^{14}, Orn^{16}(ivDde), D^{21}(OPp)]ADM(14–52)$ del Ejemplo **9** y $[G^{14}, D^{16}(OPp), Dpr^{21}(Mtt)]ADM(14–52)$

del Ejemplo **26** en forma automatizada según lo descrito en el método general.

Se protegió el extremo N-terminal de todos los compuestos con Fmoc, excepto por los ejemplos **9** y **26**, donde se incorporó Boc Gly–OH como aminoácido terminal.

La secuencia de acoplamiento de ADM(22–52) era la siguiente:

Ciclo de Acoplamiento	ADM(22–52)	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	51
3.	Gln(Trt)	50
4.	Pro	49
5.	Ser(tBu)	48
6.	Ile	47
7.	Lys(Boc)	46
8.	Ser(tBu)	45
9.	Arg(Pbf)	44
10.	Pro	43
11.	Ala	42
12.	Val	41
13.	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	37
17.	Lys(Boc)	36
18.	Asp(tBu)	35

19.	Thr(tBu)	34
20.	Phe	33
21.	Gln(Trt)	32
22.	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	30
24.	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	28
26.	Ala	27
27.	Leu	26
28.	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	24
30.	Val	23
31.	Thr(tBu)	22

Las secuencias de acoplamiento de los compuestos **9** y **26** eran las siguientes:

Ciclo de Acoplamiento	Ejemplo 9	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	51
3.	Gln(Trt)	50
4.	Pro	49
5.	Ser(tBu)	48
6.	Ile	47
7.	Lys(Boc)	46
8.	Ser(tBu)	45
9.	Arg(Pbf)	44

10.	Pro	43
11.	Ala	42
12.	Val	41
13.	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	373
17.	Lys(Boc)	36
18.	Asp(tBu)	35
19.	Thr(tBu)	34
20.	Phe	33
21.	Gln(Trt)	32
22.	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	30
24.	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	28
26.	Ala	27
27.	Leu	26
28.	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	24
30.	Val	23
31.	Thr(tBu)	22
32.	Asp(PP)	21
33.	Thr(tBu)	20
34.	Gly	19

35.	Phe	18
36.	Arg(Pbf)	17
37.	Orn(ivDde)	16
38.	Gly	15
39.	Boc-Gly-OH	14

El aminoácido 21 de los compuestos 3–8, 10, 11 y 19–22 (véase la tabla que aparece a continuación) se acopló manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la posterior desprotección de Fmoc mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 10 min.

Ejemplo	AA 21
3	Fmoc-Asp(OPp)-OH
4	Fmoc-Dab(Dde)-OH
5	Fmoc-Asp(OPp)-OH
6	Fmoc-Dpr(ivDde)-OH
7	Fmoc-Glu(OPp)-OH
8	Fmoc-Orn(ivDde)-OH
10	Fmoc-Dab(Dde)-OH
11	Fmoc-Glu(OPp)-OH
19	Fmoc-Orn(ivDde)-OH
20	Fmoc-Glu(OPp)-OH
21	Fmoc-Asp(OPp)-OH
22	Fmoc-Lys(Mmt)-OH

Se acoplaron los siguientes cuatro aminoácidos de los compuestos 3–8, 10, 11 y 19–22 manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de

aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la desprotección de Fmocdespués de los primeros tres acoplamientos mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 10 min.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de Acoplamiento	Ejemplos 3–8 , 10 y 11	AA de ADM humana
1.	Fmoc–Thr(tBu)–OH	20
2.	Fmoc–Gly–OH	19
3.	Fmoc–Phe–OH	18
4.	Fmoc–Arg(Pbf)–OH	17

Se acopló manualmente el aminoácido 16 de los Ejemplos **3–8**, **10**, **11** y **19–22** (véase la tabla a continuación) utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la desprotección posterior de Fmoc mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 10 min.

Example	AA 16
3	Fmoc–Dpr(Mtt)–OH
4	Fmoc–Asp(PP)–OH
5	Fmoc–Dab(Dde)–OH
6	Fmoc–Glu(PP)–OH
7	Fmoc–Dpr(Mtt)–OH
8	Fmoc–Asp(PP)–OH
10	Fmoc–Glu(PP)–OH

11	Fmoc-Dab(Dde)-OH
19	Fmoc-Glu(OPp)-OH
20	Fmoc-Orn(ivDde)-OH
21	Fmoc-Lys(Mmt)-OH
22	Fmoc-Asp(OPp)-OH

The following two amino acids of compounds **3–8**, **10**, **11** y **19–22** were coupled manually utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC in DMF como solvente durante aprox. 24 h. Fmoc-deprotection after the first coupling was achieved mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de Acoplamiento	Ejemplos 3–8 , 10 y 11	AA de ADM humana
1.	Fmoc-Gly-OH	15
2.	Boc-Gly-OH	14

Para la remoción simultánea de grupos protectores Dde/ivDde, se trataron las resinas de los compuestos **4–6** y **8–11**, **19** y **20** con monohidrato de hidrazina al 3 % en DMF (v/v) (15 x 10 min, 1 mL).

Se aplicaron las siguientes etapas para la síntesis de los compuestos **3–11**, **19–22** y **26**.

Para la remoción simultánea de grupos protectores Mmt/OPp, se trataron las resinas con TFA/TIS/DCM (2:5:93, v/v/v) (15 x 2 min, 1 mL).

Posteriormente, se lavaron las resinas con DIPEA al 2 % en DMF (v/v) dos veces durante 10 min (1 mL).

Se llevó a cabo la ciclación utilizando un exceso sextuplicado de HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

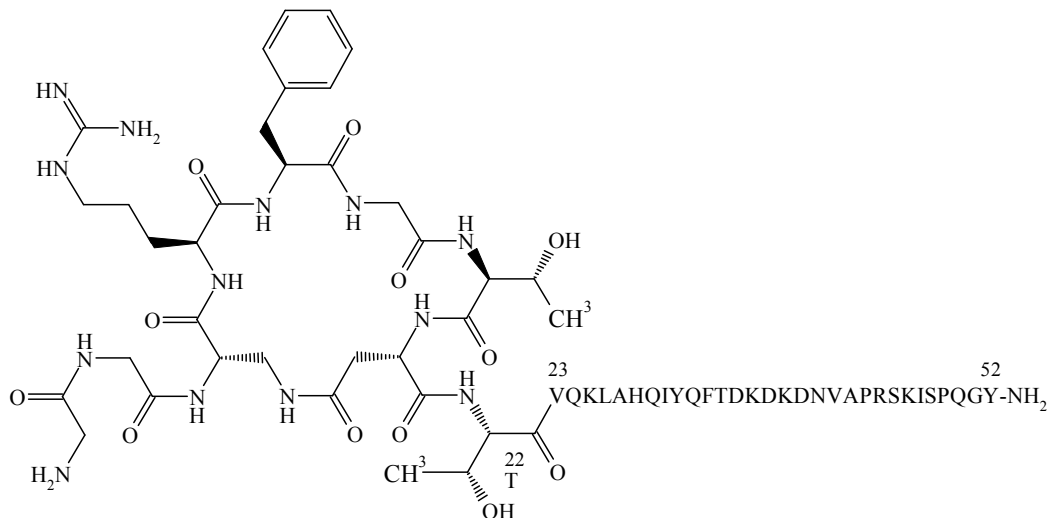
La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales se logró con TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) durante aprox. 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo /*n*-hexano (4/1; v/v) y posteriormente se liofilizaron.

La purificación de los compuestos **3–11**, **19** y **20** se llevó a cabo utilizando RP–HPLC preparativa en una columna C18 (XBridge BEH130 Prep C18 10µm OBD: 250 mm × 19 mm, 10 µm). Se aplicó un gradiente lineal de 10 % al 45 % de eluyente B en A durante 30 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 20 mL/min, Se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

La purificación de los compuestos **21**, **22**, y **26** se llevó a cabo utilizando RP–HPLC preparativa en una columna C18 (Kinetex® 5µm XB–C18 100Å: 250 mm × 21,2 mm, 5µm). Se aplicó un gradiente lineal del 10 % al 45 % de eluyente B en A durante 30 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 20 mL/min, se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

Datos analíticos:

Se confirmó la identidad de los péptidos por medio de MALDI–MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI–MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP–HPLC analítica.

Ejemplo 3: $[G^{14}, (Dpr^{16}, D^{21})_{lac}]ADM(14-52)$ 

((2S,5S,11S,14S,19S)-19-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,16,20-hexaoxo-1,4,7,10,13,17-hexaazacicloicosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{191}H_{298}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4332,215 Da

Peso Molecular: 4334,83 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo 3 en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,9 mg (2,9 % de teoría).

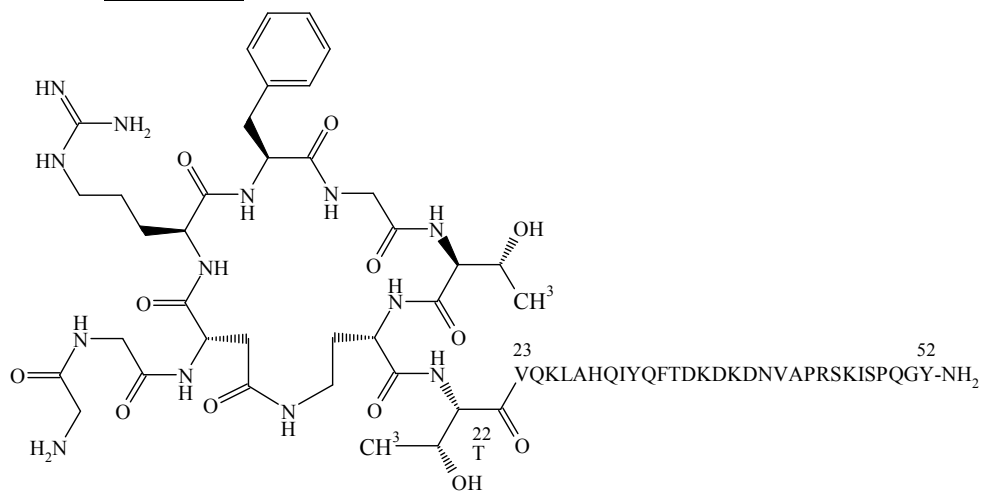
Se analizó el Ejemplo 3 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 27,8 min, pureza $\geq$ 95 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å

(Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 31,3 min, pureza ≥ 95 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1084,5 [M+4H]⁴⁺, 867,8 [M+5H]⁵⁺, 723,5 [M+6H]⁶⁺, 620,3 [M+7H]⁷⁺, 542,8 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4333,2 [M+H]⁺, 2167,1 [M+2H]²⁺.

Ejemplo 4: [G¹⁴, (D¹⁶, Dab²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,20S)–20–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–bencil–2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,18,21–hexaaxo–1,4,7,10,13,17–hexaazaciclohenicosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: C₁₉₂H₃₀₀N₅₈O₅₈

Masa Exacta: 4346,231 Da

Peso Molecular: 4348,86 g/mol

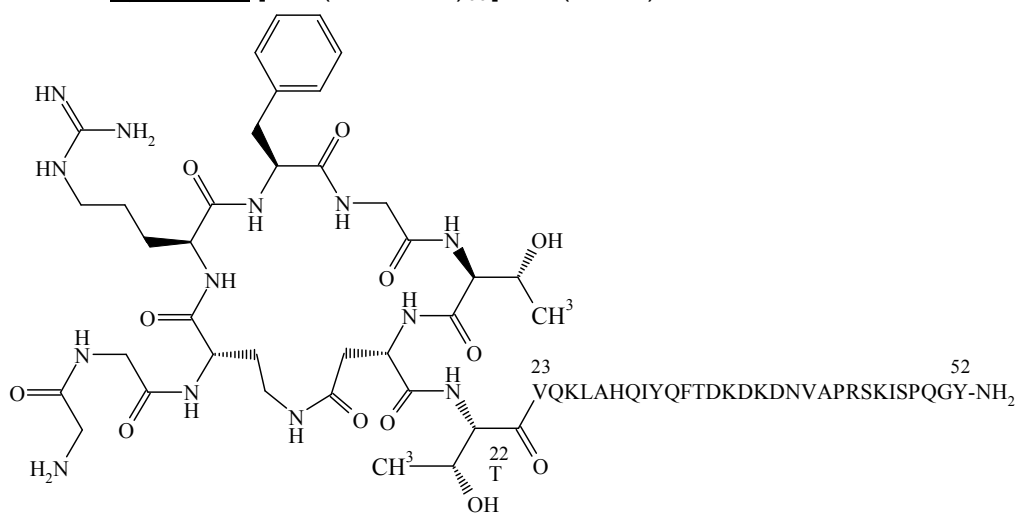
Se sintetizó el ejemplo 4 en una escala de 15 µmol. El rendimiento fue de 1,8 mg (2,6 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo 4 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4µm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 26,3 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 29,5 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1088,3 [M+4H]⁴⁺, 870,7 [M+5H]⁵⁺, 725,9 [M+6H]⁶⁺, 622,2 [M+7H]⁷⁺, 544,5 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4347,2 [M+H]⁺, 2174,1[M+2H]²⁺.

Ejemplo 5: [G¹⁴, (Dab¹⁶, D²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,20S)-20-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,16,21-hexaoxo-1,4,7,10,13,17-hexaazaciclohenicosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{192}H_{300}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4346,231 Da

Peso Molecular: 4348,86 g/mol

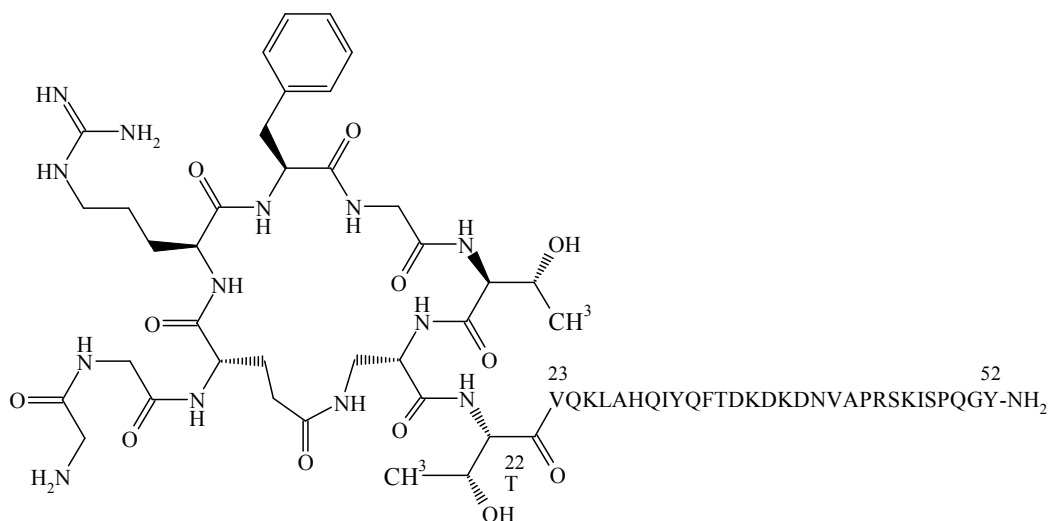
Se sintetizó el Ejemplo 5 en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,4 mg (1,9 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo 5 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 26,1 min, pureza $\geq$ 90 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 29,1 min, pureza $\geq$ 90 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1088,1 [M+4H]⁴⁺, 870,7 [M+5H]⁵⁺, 725,8 [M+6H]⁶⁺, 622,2 [M+7H]⁷⁺, 544,5 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4347,2 [M+H]⁺, 2174,1[M+2H]²⁺.

Ejemplo 6: [G¹⁴, (E¹⁶, Dpr²¹)_{iac}]ADM(14-52)



((3S,6S,12S,15S,18S)–18–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–12–bencil–
15–(3–guanidinopropil)–6–((R)–1–hidroxietil)–5,8,11,14,17,21–hexaoxo–
1,4,7,10,13,16–hexaazaciclohenicosano–3–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: C₁₉₂H₃₀₀N₅₈O₅₈

Masa Exacta: 4346,231 Da

Peso Molecular: 4348,86 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo 6 en una escala de 15 µmol. El rendimiento fue de 1,2 mg (1,7 % de teoría).

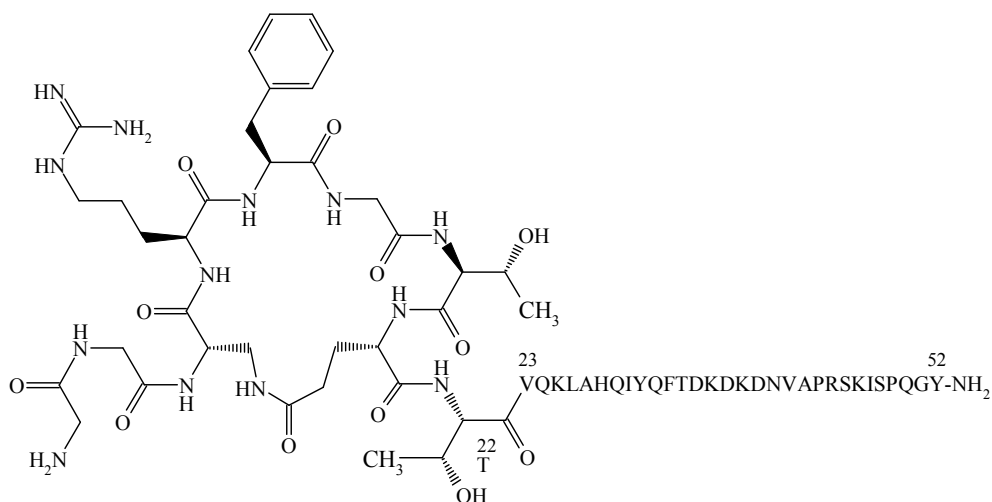
Se analizó el Ejemplo 6 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4µm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,9 min, pureza ≥ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del

10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,6 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1088,3 $[M+4H]^{4+}$, 870,6 $[M+5H]^{5+}$, 725,7 $[M+6H]^{6+}$, 622,2 $[M+7H]^{7+}$, 544,5 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4347,2 $[M+H]^+$, 2174,1 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 7: $[G^{14}, (Dpr^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$



((3S,9S,12S,15S,21S)-15-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-9-bencil-12-(3-guanidinopropil)-3-((R)-1-hidroxietil)-2,5,8,11,14,18-hexaoxo-1,4,7,10,13,17-hexaazaciclohenicosano-21-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{192}H_{300}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4346,231 Da

Peso Molecular: 4348,86 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo 7 en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de

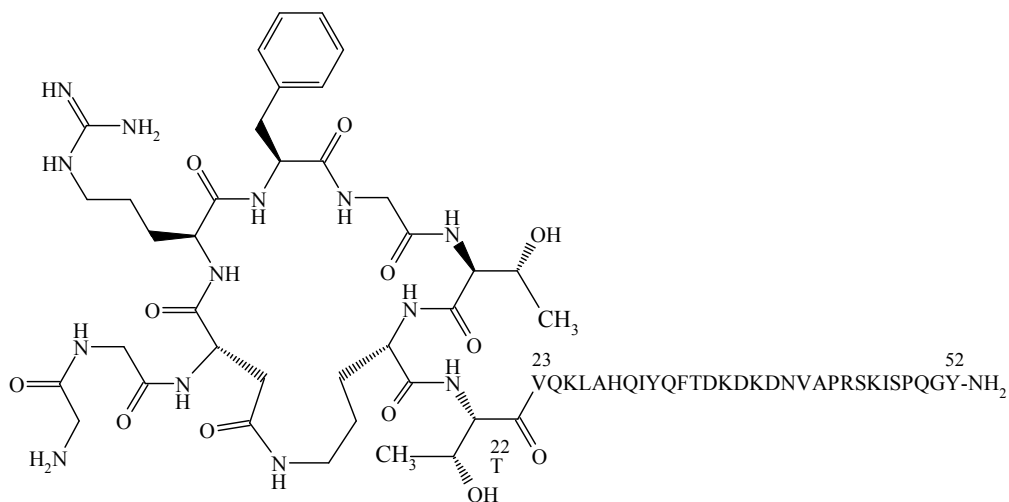
1,8 mg (2,7 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo 7 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4µm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,4 min, pureza ≥ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,2 min, pureza ≥ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1088,6 [M+4H]⁴⁺, 870,6 [M+5H]⁵⁺, 725,7 [M+6H]⁶⁺, 622,2 [M+7H]⁷⁺, 544,5 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4347,2 [M+H]⁺, 2174,0[M+2H]²⁺.

Ejemplo 8: [G¹⁴, (D¹⁶, Orn²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,21S)–21–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–bencil–
2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,19,22–hexaoxo–
1,4,7,10,13,18–hexaazaciclodocosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{193}H_{302}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4360,247 Da

Peso Molecular: 4362,89 g/mol

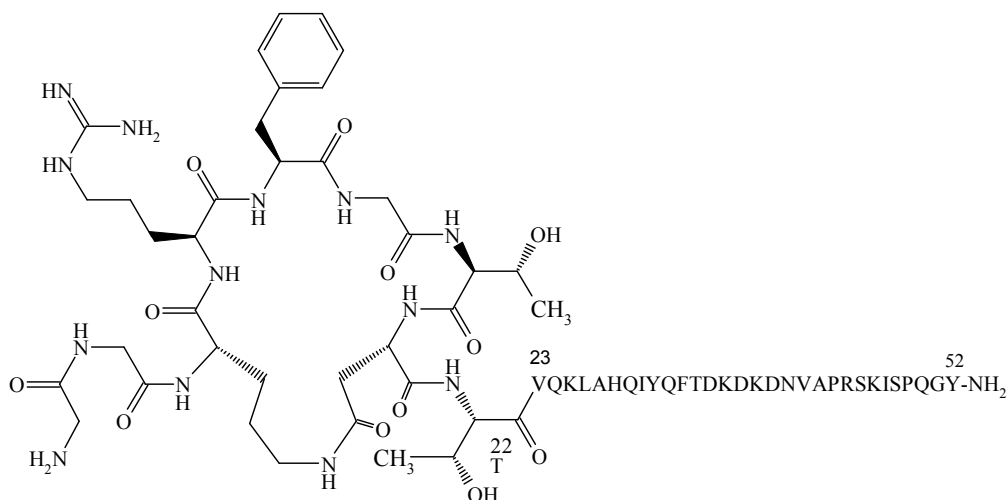
Se sintetizó el Ejemplo 8 en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 2,4 mg (3,7 % de teoría, pureza $\geq$ 95 %).

Se analizó el Ejemplo 8 por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,1 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,8 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1091,5 [M+4H]⁴⁺, 873,8 [M+5H]⁵⁺, 728,1 [M+6H]⁶⁺, 624,3 [M+7H]⁷⁺, 546,3 [M+8H]⁸⁺; MALDI–TOF: m/z = 4361,3 [M+H]⁺, 2181,1 [M+2H]²⁺.

Ejemplo 9: [G¹⁴, (Orn¹⁶, D²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,21S)–21–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–bencil–
2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,16,22–hexaoxo–
1,4,7,10,13,17–hexaazaciclodocosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{193}H_{302}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4360,247 Da

Peso Molecular: 4362,89 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **9** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 7,9 mg (12,1 % de teoría).

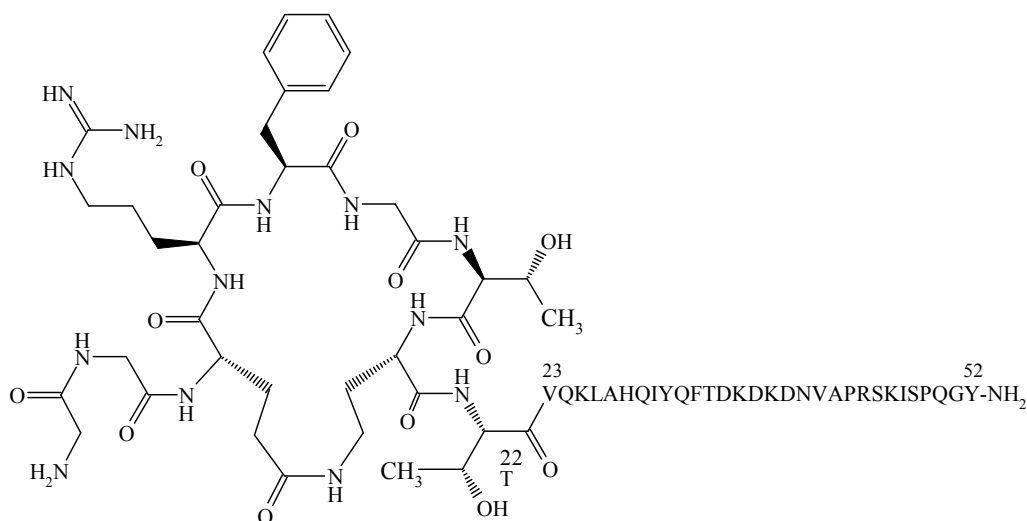
Se analizó el Ejemplo **9** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,1 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en

agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,9 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1091,7 $[M+4H]^{4+}$, 873,5 $[M+5H]^{5+}$, 728,1 $[M+6H]^{6+}$, 624,3 $[M+7H]^{7+}$, 546,3 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4361,2 $[M+H]^+$, 2181,0 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 10: $[G^{14}, (E^{16}, Dab^{21})_{lac}]ADM(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,21S)-21-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropyl)-11-((R)-1-hidroxiethyl)-3,6,9,12,18,22-hexaoxa-1,4,7,10,13,17-hexaazaciclodocosano-14-carbonil-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{193}H_{302}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4360,247 u

Peso Molecular: 4362,89 g/mol

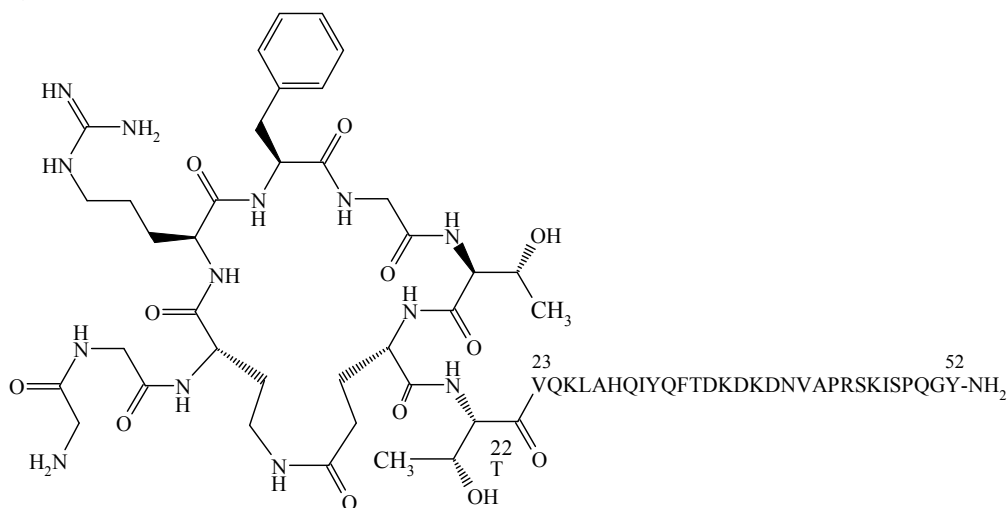
Se sintetizó el Ejemplo **10** en una escala de 15 μmol . El rendimiento fue de 1,9 mg (3,0 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **10** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μm , 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,5 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm , 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,3 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1091,7 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 873,6 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 728,1 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 624,3 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 546,3 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4361,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2181,0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Ejemplo 11: $[\text{G}^{14}, (\text{Dab}^{16}, \text{E}^{21})_{\text{lac}}]\text{ADM}(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,21S)–21–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–bencil–
2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,17,22–hexaoxo–
1,4,7,10,13,18–hexaazaciclodocosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{193}H_{302}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4360,247 Da

Peso Molecular: 4362,89 g/mol

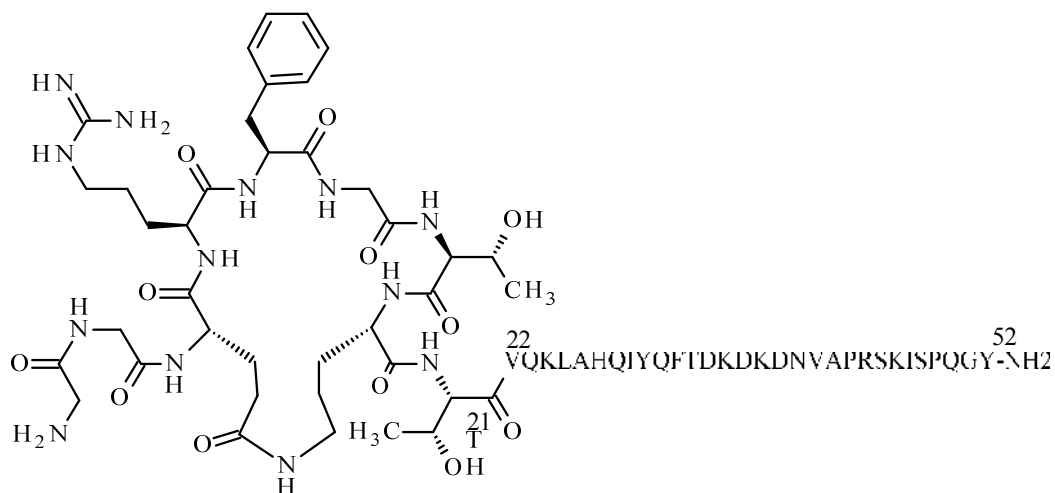
Se sintetizó el Ejemplo **11** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,5 mg (2,3 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **11** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,8 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,6 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1091,9 [M+4H]⁴⁺, 873,5 [M+5H]⁵⁺, 728,1 [M+6H]⁶⁺, 624,3 [M+7H]⁷⁺, 546,3 [M+8H]⁸⁺; MALDI–TOF: m/z = 4361,2 [M+H]⁺, 2181,0 [M+2H]²⁺.

Ejemplo 19: [G¹⁴, (E¹⁶, Orn²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,22S)-22-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,19,23-hexaaxo-1,4,7,10,13,18-hexaazaciclotricosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{194}H_{304}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4374,26Da

Peso Molecular: 4376,91g/mol

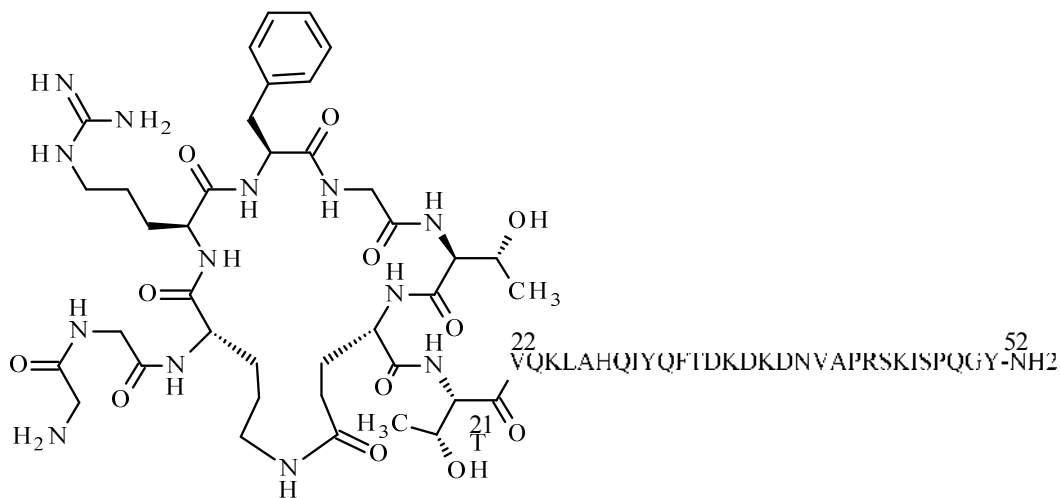
Se sintetizó el Ejemplo **19** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,6 mg (2,4 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **19** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,2 min, pureza $\geq$ 95 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 23,2 min, pureza ≥ 95 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1095,4 [M+4H]⁴⁺, 876,4 [M+5H]⁵⁺, 730,5 [M+6H]⁶⁺, 626,3 [M+7H]⁷⁺, 548,1 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4375,3 [M+H]⁺, 2188,0 [M+2H]²⁺.

Ejemplo 20: [G¹⁴, (Orn¹⁶, E²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,22S)–22–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–5–bencil–
2–(3–guanidinopropil)–11–((R)–1–hidroxietil)–3,6,9,12,17,23–hexaaxo–
1,4,7,10,13,18–hexaazaciclotricosano–14–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{194}H_{304}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4374,26 Da

Peso Molecular: 4376,91 g/mol

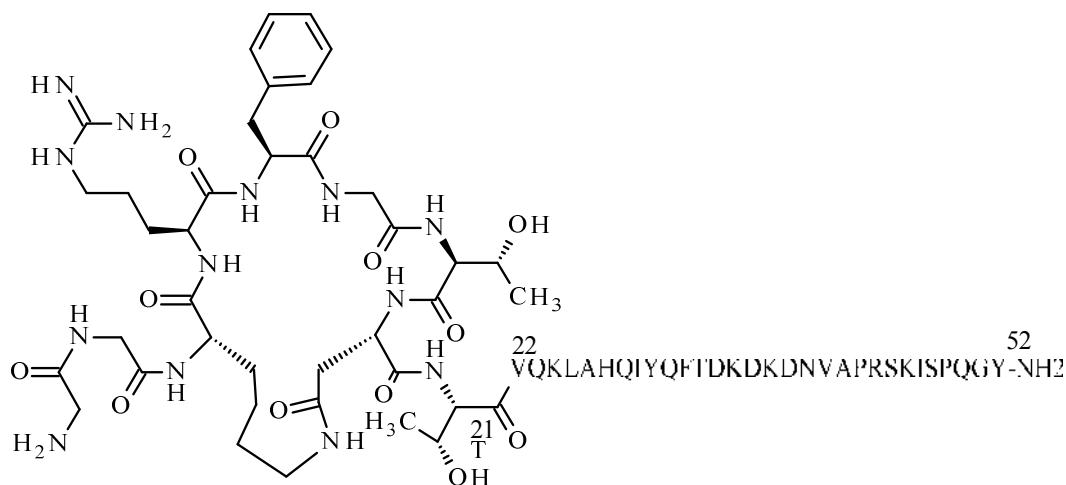
Se sintetizó el Ejemplo **20** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,7 mg (2,6 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **20** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,8 min, pureza $\geq$ 95 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 22,9 min, pureza $\geq$ 95 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1095,4 [M+4H]⁴⁺, 876,3 [M+5H]⁵⁺, 730,5 [M+6H]⁶⁺, 626,3 [M+7H]⁷⁺, 548,1 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4375,2 [M+H]⁺, 2188,0 [M+2H]²⁺.

Ejemplo 21: [G¹⁴, (K¹⁶, D²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((2S,5S,11S,14S,22S)-22-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-
2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,16,23-hexaoxo-
1,4,7,10,13,17-hexaazaciclotricosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: C₁₉₄H₃₀₄N₅₈O₅₈

Masa Exacta: 4374,26 Da

Peso Molecular: 4376,91 g/mol

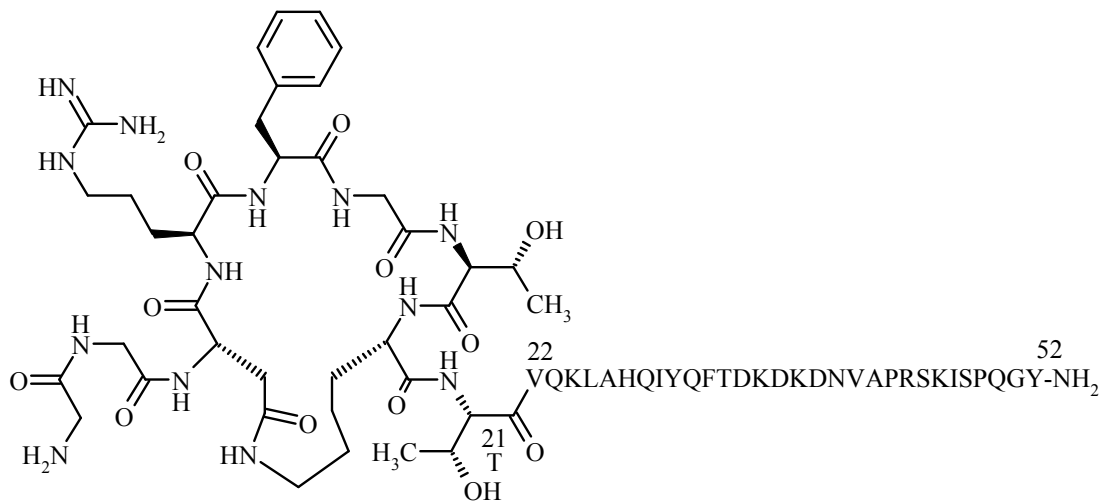
Se sintetizó el Ejemplo **21** en una escala de 15 µmol. El rendimiento fue de 0,3 mg (0,5 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **21** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4µm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 26,1 min, pureza ≥ 95 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 25,9 min, pureza ≥ 95 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1095,5 [M+4H]⁴⁺, 876,3 [M+5H]⁵⁺, 730,5 [M+6H]⁶⁺, 626,3 [M+7H]⁷⁺, 548,1 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4375,2 [M+H]⁺, 2188,1 [M+2H]²⁺, 1459,1 [M+3H]³⁺.

Ejemplo 22: [G¹⁴, (D¹⁶, K²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((3S,9S,12S,15S,23S)–15–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–9–bencil–12–(3–guanidinopropil)–3–((R)–1–hidroxietil)–2,5,8,11,14,17–hexaaxo–1,4,7,10,13,18–hexaazaciclotricosano–23–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: C₁₉₄H₃₀₄N₅₈O₅₈

Masa Exacta: 4374,26 Da

Peso Molecular: 4376,91 g/mol

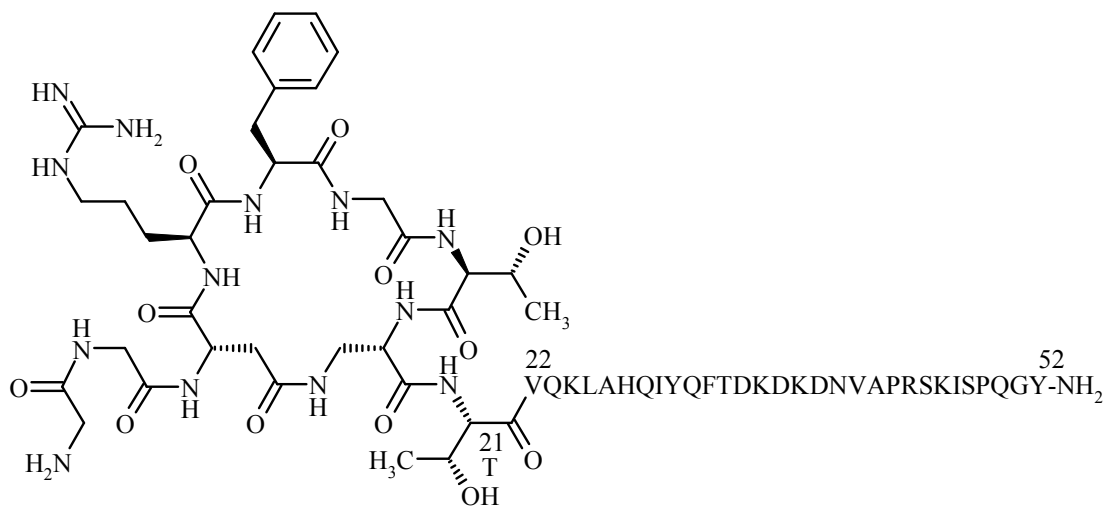
Se sintetizó el Ejemplo **22** en una escala de 15 μmol . El rendimiento fue de 0,8 mg (1,2 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **22** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μm , 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 25,9 min, pureza $\geq$ 95 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm , 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 25,8 min, pureza $\geq$ 95 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1095,0 [M+4H]⁴⁺, 876,3 [M+5H]⁵⁺, 730,5 [M+6H]⁶⁺, 626,3 [M+7H]⁷⁺, 548,1 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4375,2 [M+H]⁺, 2188,1 [M+2H]²⁺, 1459,1 [M+3H]³⁺.

Ejemplo 26: [G¹⁴, (D¹⁶, Dpr²¹)_{lac}]ADM(14–52)



((3S,6S,12S,15S,18S)–18–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–12–bencil–15–
(3–guanidinopropil)–6–((R)–1–hidroxietil)–5,8,11,14,17,20–hexaoxo–
1,4,7,10,13,16–hexaazacicloicosano–3–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{191}H_{298}N_{58}O_{58}$

Masa Exacta: 4332,215 Da

Peso Molecular: 4334,83 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **26** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 3,8 mg (5,8% de teoría).

Se analizó el Ejemplo **26** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 26,1 min, pureza $\geq$ 90 %

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 26,1 min, pureza ≥ 90 %

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1084,5 [M+4H]⁴⁺, 867,9 [M+5H]⁵⁺, 723,5 [M+6H]⁶⁺, 620,3 [M+7H]⁷⁺, 542,9 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4333,2 [M+H]⁺, 2167,1 [M+2H]²⁺.

Análogos de Adrenomedulina con puente de Lactama Palmitoilados 12, 13, y 18

Síntesis:

Se sintetizaron los Ejemplos **12**, **13**, y **18** utilizando el método general descrito anteriormente.

Las secuencias de acoplamiento eran las siguientes:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 18	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	Gly	Gly	51
3.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	Gln(Trt)	50
4.	Pro	Pro	Pro	49
5.	Ser(tBu)	Ser(tBu)	Ser(tBu)	48

6.	Ile	Ile	Ile	47
7.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Lys(Boc)	46
8.	Ser(tBu)	Ser(tBu)	Ser(tBu)	45
9.	Arg(Pbf)	Arg(Pbf)	Arg(Pbf)	44
10.	Pro	Pro	Pro	43
11.	Ala	Ala	Ala	42
12.	Val	Val	Val	41
13.	Asn(Trt)	Asn(Trt)	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	Asp(tBu)	37
17.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Lys(Boc)	36
18.	Asp(tBu)	Asp(tBu)	Asp(tBu)	35
19.	Thr(tBu)	Thr(tBu)	Thr(tBu)	34
20.	Phe	Phe	Phe	33
21.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	Gln(Trt)	32
22.	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	Ile	Ile	30
24.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	His(Trt)	His(Trt)	28
26.	Ala	Ala	Ala	27
27.	Leu	Leu	Leu	26
28.	Lys(Boc)	Lys(Boc)	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	Gln(Trt)	Gln(Trt)	24
30.	Val	Val	Val	23

31.	Thr(tBu)	Thr(tBu)	Thr(tBu)	22
32.	Lys(Mmt)	Glu(OPp)		21
33.	Thr(tBu)	Thr(tBu)		20
34.	Gly	Gly		19
35.	Phe	Phe		18
36.	Arg(Pbf)	Arg(Pbf)		17
37.	Glu(OPp)	Lys(Mmt)		16
38.	Gly	Gly		15

Luego de la síntesis automatizada de la secuencia ADM(15–52), para los ejemplos **12** y **13** se acopló el aminoácido N-terminal Boc–Lys(Fmoc)–OH manualmente con HOBt y DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μ mol). Se llevó a cabo la reacción en DMF como solvente durante 24 h.

Para el ejemplo **18**, se acopló Fmoc–Glu(OPp)–OH (AA 21) manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Luego de la desprotección de Fmoc, se alargó la secuencia de péptidos automáticamente utilizando el método general descrito con anterioridad.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

33.	Thr(tBu)	20
34.	Gly	19
35.	Phe	18
36.	Arg(Pbf)	17

Para el ejemplo **18**, se acopló Fmoc–Dpr(Mtt)–OH (AA 16) después

manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

Se logró la remoción de los grupos de protección OPp, Mmt y Mtt mediante el tratamiento de la resina (20 x 2 min) con un cóctel de escisión que consistió en TFA/TIS/DCM (1:5:94, v/v/v) para los ejemplos **12** y **13** y TFA/TIS/DCM (2:5:93, v/v/v) para el ejemplo **18**. Posteriormente, se lavó la resina (2 x 5 min) con DIPEA al 5 % en DMF para los ejemplos **12** y **13** y con DIPEA al 2 % en DMF para el ejemplo **16**.

Se introdujo el puente de lactama mediante la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales del AA 16 y AA 21. Para los ejemplos **12** y **13** la reacción se llevó a cabo utilizando un exceso de 10 veces (150 μ mol) y para el ejemplo **18** un exceso de 6 veces (90 μ mol) de HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h a temperatura ambiente.

Para el ejemplo **18**, se acoplaron los aminoácidos Fmoc-Gly-OH (AA 15) y Boc-Lys(Fmoc)-OH (AA 14) manualmente con HOBt y DIC en un exceso molar de cinco veces (75 μ mol). Las reacciones se llevaron a cabo en DMF como solvente durante 24 h.

Posteriormente, se eliminó el Fmoc de la lisina N-terminal utilizando piperidina al 30 % en DMF (v/v) dos veces 10 min.

Se logró la palmitoilación de la cadena lateral de lisina libre utilizando un exceso quintuplicado (75 μ mol) de ácido palmítico, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales se logró con TFA/TIS/H₂O (90:5:5, v/v/v) para los ejemplos **12** y **13** y TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) para el ejemplo **18** durante 3 h.

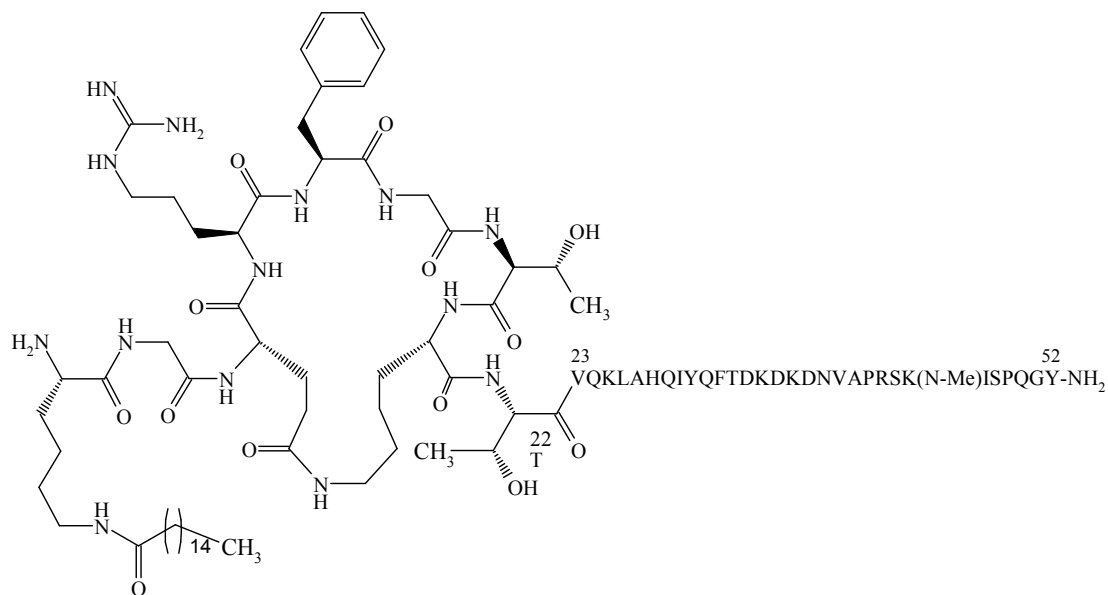
Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo y luego se liofilizaron.

La purificación de los péptidos crudos se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (Phenomenex Jupiter 10u Proteo 90 Å: 250 mm × 21,2 mm, 10 µm, 90 Å). Para el ejemplo **12**, se aplicó un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min, para el ejemplo **13**, se aplicó un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 10 mL/min para el ejemplo **12** y **15** mL/min para el ejemplo **13**. Se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

La purificación del Ejemplo **18** se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (Kinetex® 5µm XB-C18 100Å: 250 mm × 21,2 mm, 5 µm). Se aplicó un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 20 mL/min. Se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

Analítica:

Se confirmó la identidad de los péptidos por medio de MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 12: $[K^{14}(PAM), (E^{16}, K^{21})_{lac}]ADM(14-52)$ 

((2S,5S,11S,14S,23S)-23-(2-((S)-2-amino-6-palmitamidohexanamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,20,24-hexaoxo-1,4,7,10,13,19-hexaazaciclotetracosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{215}H_{345}N_{59}O_{59}$

Masa Exacta: 4697,58 Da

Peso Molecular: 4700,47 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **12** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 5,3 mg (7,6 % de teoría).

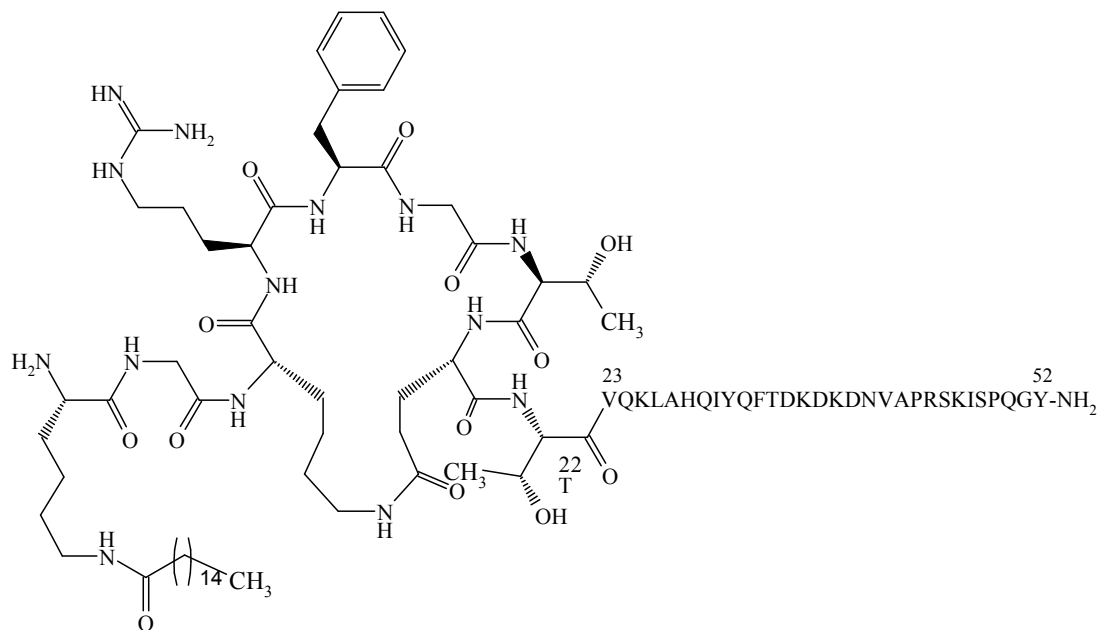
Se analizó el Ejemplo **12** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 50

min. $R_t = 39,7$ min, pureza ≥ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 100 % de eluyente B en A durante 60 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; $\lambda = 220$ nm). $R_t = 30,7$ min, pureza ≥ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): $m/z = 1175,9$ $[M+4H]^{4+}$, 941,0 $[M+5H]^{5+}$, 784,4 $[M+6H]^{6+}$, 672,6 $[M+7H]^{7+}$, 588,8 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: $m/z = 4698,8$ $[M+H]^+$, 2349,7 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 13: $[K^{14}(\text{PAM}), (K^{16}, E^{21})_{\text{lac}}]_{\text{ADM}}(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,23S)-23-(2-((S)-2-amino-6-

palmitamidohexanamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,17,24-hexaoxo-1,4,7,10,13,18-hexaazaciclotetracosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{215}H_{345}N_{59}O_{59}$

Masa Exacta: 4697,58 Da

Peso Molecular: 4700,47 g/mol

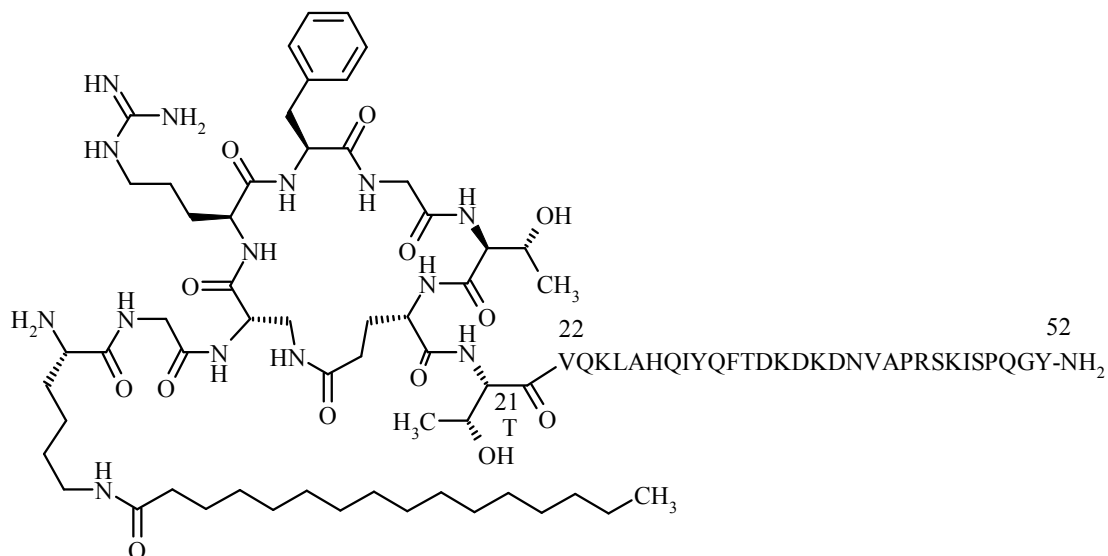
Se sintetizó el Ejemplo **13** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 3,5 mg (5,0 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **13** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min.). R_t = 41,2 min, pureza $\geq$ 95 %.

Asimismo, se utilizó un gradiente lineal del 10 % al 100 % de eluyente B en A durante 60 min. (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 30,8 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1175,9 $[M+4H]^{4+}$, 941,0 $[M+5H]^{5+}$, 784,4 $[M+6H]^{6+}$, 672,6 $[M+7H]^{7+}$, 588,8 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4698,7 $[M+H]^+$, 2349,75 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 18: $[K^{14}(PAM), (Dpr^{16}, E^{21})_{lac}]ADM(14-52)$



((3S,9S,12S,15S,21S)–15–(2–((S)–2–amino–6–
palmitamidohexanamido)acetamido)–9–bencil–12–(3–guanidinopropil)–3–((R)–
1–hidroxietil)–2,5,8,11,14,18–hexaoxo–1,4,7,10,13,17–hexaazaciclohenicosano–
21–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{212}H_{339}N_{59}O_{59}$

Masa Exacta: 4655,53 Da

Peso Molecular: 4658,40 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **18** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 2,4 mg (3,4 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **18** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min.). R_t = 34,1 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å), aplicando un gradiente lineal del

20 % al 70 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 29,4 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1165,5 $[M+4H]^{4+}$, 932,7 $[M+5H]^{5+}$, 777,3 $[M+6H]^{6+}$, 666,5 $[M+7H]^{7+}$, 583,3 $[M+8H]^{8+}$; MALDI–TOF: m/z = 4656,6 $[M+H]^+$, 2328,7 $[M+2H]^{2+}$.

Análogo de Adrenomedulina 14 con Isoleucina⁴⁷ N–metilada

Síntesis:

Se sintetizó la secuencia ADM(48–52) utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 14	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	51
3.	Gln(Trt)	50
4.	Pro	49
5.	Ser(tBu)	48

Después de la síntesis automatizada de la secuencia ADM(48–52), se acopló manualmente la Isoleucina N-metilada Fmoc–protegida con HOBT y DIC en un exceso quintuplicado. La reacción se llevó a cabo en DMF como solvente durante 24 h.

Luego de la eliminación del grupo protector Fmoc, se acopló manualmente

Fmoc-Lys(Boc)-OH con un exceso molar quintuplicado de aminoácido y un exceso molar de 10 veces (150 μ mol) de HOBt y DIC en DMF/DCM/NMP (1:1:1, v/v/v). La reacción se llevó a cabo a 50 °C agitando al mismo tiempo con 1300 rpm (Thermomixer, Eppendorf) durante 24 h.

Posteriormente, se llevó a cabo el alargamiento de la cadena peptídica utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 14	AA de ADM humana
8.	Ser(tBu)	45
9.	Arg(Pbf)	44
10.	Pro	43
11.	Ala	42
12.	Val	41
13.	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	37
17.	Lys(Boc)	36
18.	Asp(tBu)	35
19.	Thr(tBu)	34
20.	Phe	33
21.	Gln(Trt)	32
22.	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	30

24.	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	28
26.	Ala	27
27.	Leu	26
28.	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	24
30.	Val	23
31.	Thr(tBu)	22
32.	Lys(Mmt)	21
33.	Thr(tBu)	20
34.	Gly	19
35.	Phe	18
36.	Arg(Pbf)	17
37.	Glu(OPp)	16
38.	Gly	15

Después del alargamiento del aminoácido *N*-terminal Boc-Lys(Fmoc)-OH se acopló en forma manual con HOBt y DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μ mol) en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

Se logró la eliminación de los grupos protectores OPp y Mmt mediante el tratamiento de la resina (15 x 2 min) con un cóctel de escisión que consistió en TFA/TIS/DCM (2:5:93, v/v/v). Posteriormente, se lavó la resina (2 x 5 min) con DIPEA al 5 % en DMF.

Se introdujo el puente de lactama mediante la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales de AA 16 y AA 21. La reacción se llevó a cabo

utilizando un exceso de 10 veces (150 μmol) de HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

Posteriormente, se eliminó Fmoc de la lisina N-terminal utilizando piperidina al 30 % en DMF (v/v) durante dos veces de 10 min.

Se logró la palmitoilación de la cadena lateral de lisina libre utilizando un exceso quintuplicado (75 μmol) de ácido palmítico, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

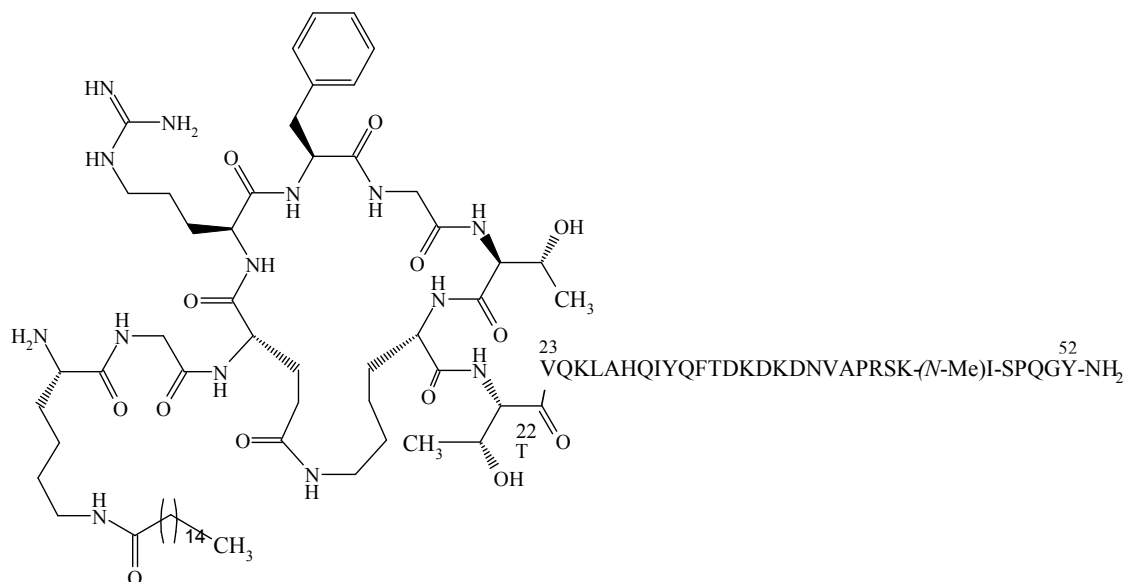
Se logró la escisión del péptido de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales con TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) durante aprox. 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo y posteriormente se liofilizaron.

La purificación del péptido crudo se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (Phenomenex Jupiter 10u Proteo 90 Å: 250 mm $\times$ 21,2 mm, 10 μm , 90 Å). Se aplicó un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 10 mL/min, Se midió la detección de UV a $\lambda = 220 \text{ nm}$.

Analítica:

Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 14: $[\text{K}^{14}(\text{PAM}), (\text{E}^{16}, \text{K}^{21})_{\text{lac}}, \text{N-Me-I}^{47}] \text{ADM}(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,23S)-23-(2-((S)-2-amino-6-palmitamidohexanamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,20,24-hexaoxo-1,4,7,10,13,19-hexaazaciclotetracosano-14-carbonil)-L-treonil-[N-Me-I⁴⁷]ADM(22-52)

Fórmula Química: C₂₁₆H₃₄₇N₅₉O₅₉

Masa Exacta: 4711,60 Da

Peso Molecular: 4714,49 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **14** en una escala de 15 µmol. El rendimiento fue de 0,6 mg (0,9 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **14** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 34,3 min, pureza ≥

90 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Vydac 218TP C18 (Grace Vydac, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å), aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). Rt = 30,9 min, pureza ≥ 90 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1179,6 [M+4H]⁴⁺, 943,8 [M+5H]⁵⁺, 786,8 [M+6H]⁶⁺, 674,5 [M+7H]⁷⁺, 590,3 [M+8H]⁸⁺; MALDI-TOF: m/z = 4712,74 [M+H]⁺, 2356,7 [M+2H]²⁺.

Análogo de Adrenomedulina 27 con lisina⁴⁶ N-metilada

Síntesis:

Se sintetizó la secuencia ADM(47–52) utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 27	AA de ADM humana
1.	Tyr(tBu)	52
2.	Gly	51
3.	Gln(Trt)	50
4.	Pro	49
5.	Ser(tBu)	48
6.	Ile(tBu)	47

Luego de la síntesis automatizada de la secuencia ADM(47–52), se acopló la lisina N-metilada, protegida con Fmoc en forma manual con HOBt y

DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μmol). La reacción se llevó a cabo en DMF como solvente durante 24 h.

Luego de la eliminación del grupo protector Fmoc, se acopló manualmente Fmoc-Ser(tBu)-OH con un exceso molar quintuplicado (75 μmol) de aminoácido y un exceso molar 10 veces superior (150 μmol) de HOBt y DIC en DMF/DCM/NMP (1:1:1, v/v/v). La reacción se llevó a cabo a 50 °C agitando al mismo tiempo con 1300 rpm (Thermomixer, Eppendorf) durante 24 h.

Posteriormente, se llevó a cabo el alargamiento de la cadena peptídica utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 27	AA de ADM humana
9.	Arg(Pbf)	44
10.	Pro	43
11.	Ala	42
12.	Val	41
13.	Asn(Trt)	40
14.	Asp(tBu)	39
15.	Lys(Boc)	38
16.	Asp(tBu)	37
17.	Lys(Boc)	36
18.	Asp(tBu)	35
19.	Thr(tBu)	34
20.	Phe	33
21.	Gln(Trt)	32

22.	Tyr(tBu)	31
23.	Ile	30
24.	Gln(Trt)	29
25.	His(Trt)	28
26.	Ala	27
27.	Leu	26
28.	Lys(Boc)	25
29.	Gln(Trt)	24
30.	Val	23
31.	Thr(tBu)	22

Se acopló manualmente Fmoc–Glu(OPp)–OH con HOBt y DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μ mol). La reacción se llevó a cabo en DMF como solvente durante 24 h.

La cadena peptídica se alargó automáticamente utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 27	AA de ADM humana
33.	Thr(tBu)	20
34.	Gly	19
35.	Phe	18
36.	Arg(Pbf)	17

Se acopló manualmente Fmoc–Dpr(Mtt)–OH con HOBt y DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μ mol). La reacción se llevó a cabo en DMF como

solvente durante 24 h.

Se logró la remoción de los grupos protectores OPp y Mtt mediante el tratamiento de la resina (12 x 2 min) con un cóctel de escisión que consistió en TFA/TIS/DCM (2:5:93, v/v/v). Posteriormente, se lavó la resina (2 x 5 min) con DIPEA al 2 % en DMF.

Se introdujo el puente de lactama mediante la formación de un enlace amida entre las cadenas laterales de AA 16 y AA 21. La reacción se llevó a cabo utilizando un exceso sextuplicado (90 μ mol) de HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

Posteriormente, Fmoc-Gly-OH y Boc-Lys(Fmoc)-OH se acoplaron manualmente con HOBt y DIC en un exceso molar quintuplicado (75 μ mol) en DMF durante aprox. 24 h. Se eliminó el Fmoc con piperidina al 30 % en DMF (v/v) durante 10 min dos veces con anterioridad a la etapa de acoplamiento y después de terminar la síntesis para generar una cadena lateral de lisina libre.

Se logró la palmitoilación de la cadena lateral de lisina libre utilizando un exceso quintuplicado (75 μ mol) de ácido palmítico, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

La escisión del péptido de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales se logró con TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) durante aprox. 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo y posteriormente se liofilizaron.

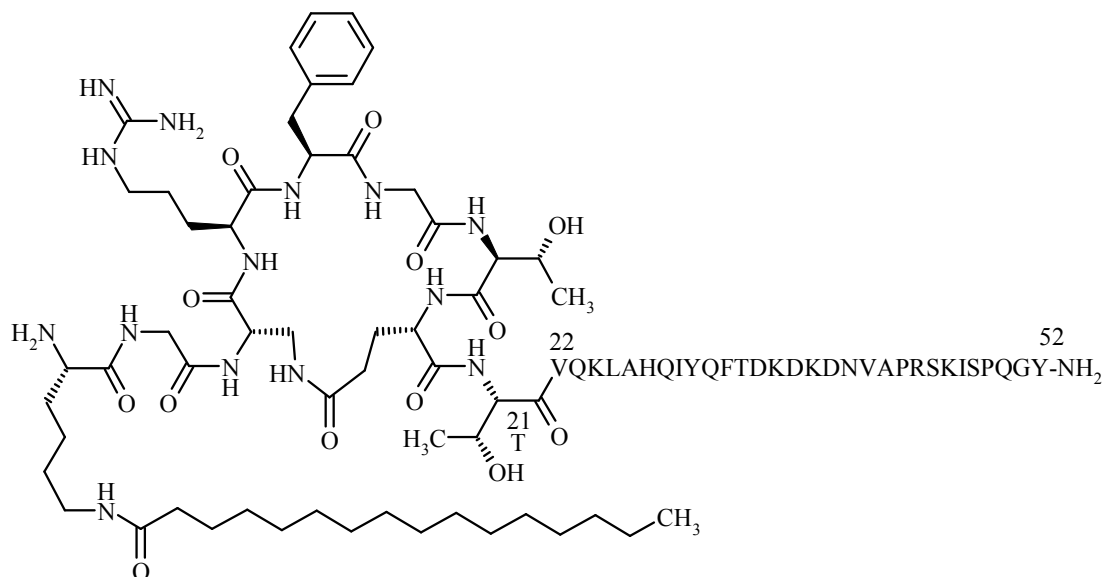
La purificación del péptido crudo se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (XBridgeBEH130 Prep C18 10 μ m OBD: 250 mm $\times$ 19 mm, 10 μ m). Se aplicó un gradiente lineal del 10 % al 70 % de eluyente B en A durante 60 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al

0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 20 mL/min. Se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

Analítica:

Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 27: $[K^{14}(\text{PAM}), (\text{Dpr}^{16}, \text{E}^{21})_{\text{lac}}, N\text{-Me-K}^{46}] \text{ADM}(14\text{--}52)$



((3S,9S,12S,15S,21S)-15-(2-((S)-2-amino-6-palmitamidohexanamido)acetamido)-9-bencil-12-(3-guanidinopropil)-3-((R)-1-hidroxietil)-2,5,8,11,14,18-hexaoxo-1,4,7,10,13,17-hexaazaciclohenicosano-21-carbonil)-L-treonil-[N-Me-K⁴⁶]ADM(22-52)

Fórmula Química: $\text{C}_{213}\text{H}_{341}\text{N}_{59}\text{O}_{59}$

Masa Exacta: 4669,55 Da

Peso Molecular: 4672,43 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **27** en una escala de 15 μmol . El rendimiento fue de 0,6 mg (0,9 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **27** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 5 μm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm , 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 34,5 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 4 μm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μm , 90 Å), aplicando un gradiente lineal del 10 % al 100 % de eluyente B en A durante 60 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 29,6 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1168,7 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 935,5 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 779,6 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 668,5 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 584,9 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4670,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2336,6 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Análogos de Adrenomedulina 15–17 con Miméticos de Enlace

Disulfuro

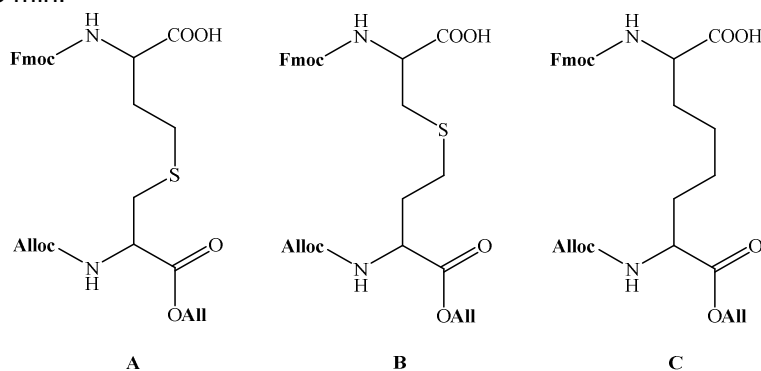
Síntesis:

Se llevaron a cabo las síntesis de los compuestos **15–17** utilizando la síntesis automatizada de péptidos de la secuencia ADM(22–52) según lo descrito en el método general. Posteriormente, se incorporaron las posiciones 21 a 14 en forma manual. Ya se había mostrado la secuencia de acoplamiento de

ADM(22–52) para los análogos con puente de lactama **3–11** con aminoácidos no proteinogénicos.

Se utilizaron los miméticos del enlace disulfuro mostrados a continuación como miméticos del enlace disulfuro. Se protegieron con Fmoc en el extremo N-terminal de la posición reemplazando ADM–C²¹ y NAlloc, OAll–protegido en los extremos N– y C–terminales de la posición reemplazando ADM–C¹⁶.

Se acoplaron los miméticos utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24h. La escisión de Fmoc se llevó a cabo utilizando piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min.



A: Fmoc–[C¹⁶→U²¹](NAlloc, OAll)–OH; N–[(9H–fluoren–9–ilmetoxi)carbonil]–S–[(2R)–3–oxo–3–(prop–2–en–1–iloxi)–2–{[(prop–2–en–1–iloxi)carbonil]amino}propil]–L–homocisteína

Se preparó el compuesto de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía técnica P. J. Knerr, A. Tzekou, D. Ricklin, H. Qu, H. Chen, W. A. van der Donk, J. D. Lambris, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 753–760 y H.–K. Cui, Y. Guo, Y. He, F.–L. Wang, H.–N. Chang, Y.–J. Wang, F.–M. Wu, C.–L. Tian, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9558–9562.

B: Fmoc-[U¹⁶→C²¹](NAlloc, OAll)-OH; N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-3-[[[(3S)-4-oxo-4-(prop-2-en-1-iloxi)-3-[[[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]amino}butil]sulfanil]-L-alanina

Se preparó el compuesto de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía técnica P. J. Knerr, A. Tzekou, D. Ricklin, H. Qu, H. Chen, W. A. van der Donk, J. D. Lambris, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 753–760 y H.-K. Cui, Y. Guo, Y. He, F.-L. Wang, H.-N. Chang, Y.-J. Wang, F.-M. Wu, C.-L. Tian, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9558–9562.

C: Fmoc-[U¹⁶→U²¹](NAlloc, OAll)-OH; ácido (2S,7S)-2-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]amino}-8-oxo-8-(prop-2-en-1-iloxi)-7-[[[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]amino}octanoico

Se preparó el compuesto de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía técnica H.-K. Cui, Y. Guo, Y. He, F.-L. Wang, H.-N. Chang, Y.-J. Wang, F.-M. Wu, C.-L. Tian, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9558–9562.

Se acoplaron los siguientes cuatro aminoácidos de los compuestos **15–17** manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la desprotección de Fmoc después de los primeros tres acoplamientos mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplos 15–17	AA de ADM humana
1.	Fmoc-Thr(tBu)-OH	20
2.	Fmoc-Gly-OH	19

3.	Fmoc-Phe-OH	18
4.	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	17

Luego de secar la resina a 40°C bajo vacío, se eliminaron los grupos protectores Alilo y Alloc utilizando un exceso molar de 1,5 veces de TPP-Pd en CHCl₃/AcOH/NMM (37:2:1, v/v/v, 1,5 mL). Se agitó la mezcla bajo atmósfera de Argón durante 2 h. Se lavó la resina dos veces durante 10 min cada vez con DIPEA al 0,5 % en DMF y DDTC al 0,5 % en DMF (p/p). Se logró la desprotección de Fmoc mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min

La lactamización se llevó a cabo utilizando un exceso molar quintuplicado de HOBt y DIC utilizando DMF como solvente durante aprox. 24 h.

Se acoplaron los siguientes dos aminoácidos de los compuestos **15–17** manualmente utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la desprotección de Fmoc después de lograr el primer acoplamiento mediante tratamiento de la resina con piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplos 15–17	AA de ADM humana
1.	Fmoc-Gly-OH	15
2.	Boc-Gly-OH	14

Se lograron la escisión de los péptidos de la resina y la desprotección

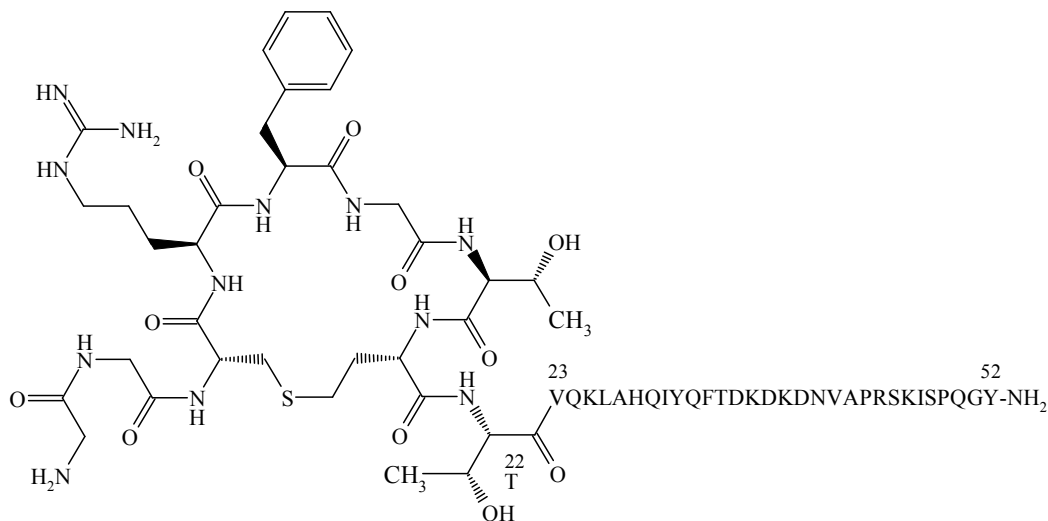
simultánea de las cadenas laterales con TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) durante aprox. 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo, y posteriormente se liofilizaron.

La purificación del péptido crudo se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (XBridge BEH130 Prep C18 10µm OBD: 250 mm×19 mm, 10µm). Se aplicó un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 50 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 15 mL/min. Se midió la detección de UV a $\lambda = 220$ nm.

Analítica:

Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 15: [G¹⁴, C¹⁶→U²¹]ADM(14–52)



((4S,7S,13S,16S,19R)–19–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–13–bencil–16–

(3-guanidinopropil)-7-((R)-1-hidroxietil)-6,9,12,15,18-pentaoxo-1-thia-5,8,11,14,17-pentaazacicloicosano-4-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{191}H_{299}N_{57}O_{57}S$

Masa Exacta: 4335,197 Da

Peso Molecular: 4337,90 g/mol

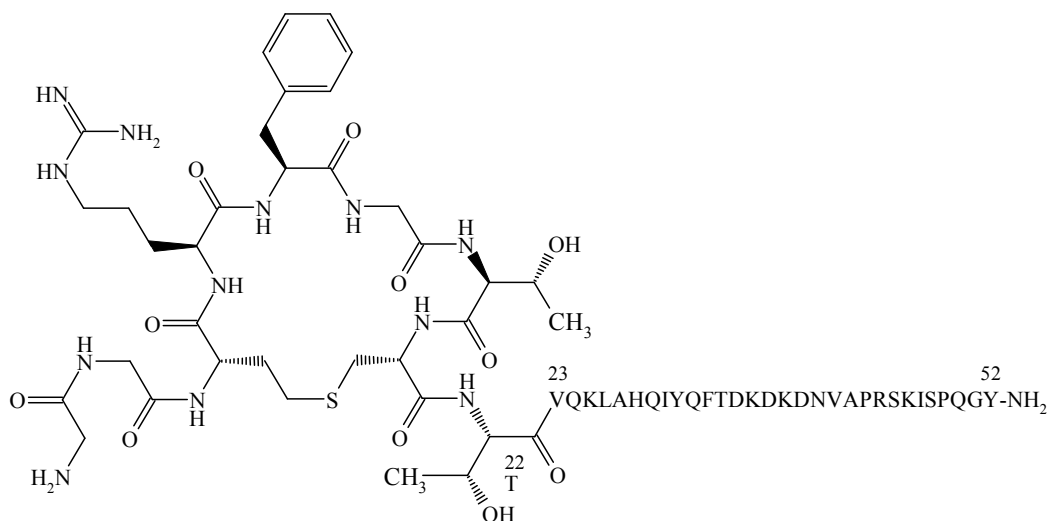
Se sintetizó el Ejemplo **15** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 1,6 mg (2,5 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **15** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min. R_t = 25,3 min, pureza $\geq$ 90 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 26,0 min, pureza $\geq$ 90 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1085,4 $[M+4H]^{4+}$, 868,5 $[M+5H]^{5+}$, 723,9 $[M+6H]^{6+}$, 602,7 $[M+7H]^{7+}$, 543,3 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4336,2 $[M+H]^+$, 2168,6 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 16: $[G^{14}, U^{16} \rightarrow C^{21}]ADM(14-52)$



((3R,6S,12S,15S,18S)–18–(2–(2–aminoacetamido)acetamido)–12–bencil–15–
 (3–guanidinopropil)–6–((R)–1–hidroxietil)–5,8,11,14,17–pentaoxo–1–tia–
 4,7,10,13,16–pentaazacicloicosano–3–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{191}H_{299}N_{57}O_{57}S$

Masa Exacta: 4335,197 Da

Peso Molecular: 4337,90 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **16** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 2,2 mg (3,4 % de teoría).

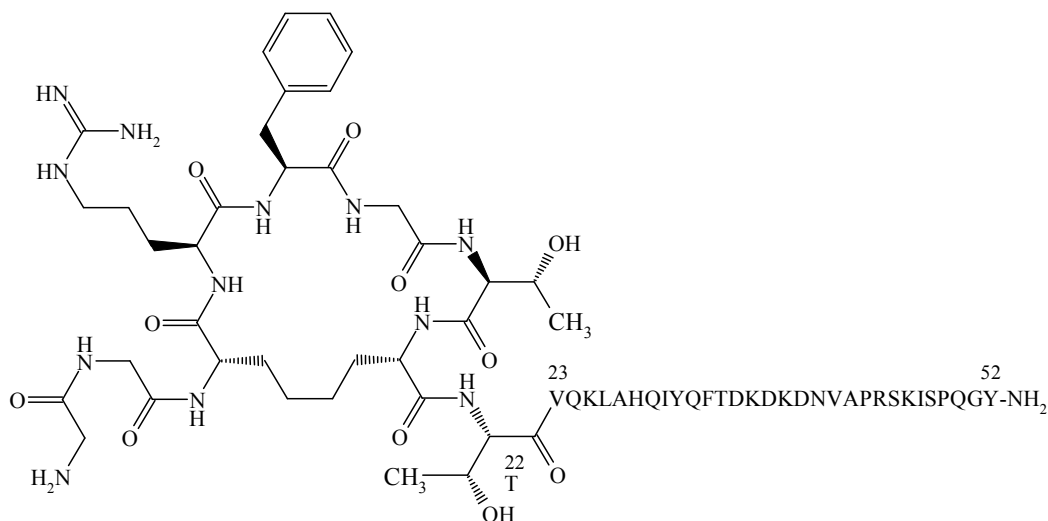
Se analizó el Ejemplo **16** por medio de RP-HPLC analítica utilizando Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min y una velocidad de flujo de 0,6 mL/min. R_t = 25,2 min.

Adicionalmente, se utilizó una columna Phenomenex Jupiter 5u Proteo 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min y una velocidad de

flujo de 0,6 mL/min. $R_t = 29,8$ min.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): $m/z = 1085,6 [M+4H]^{4+}$, $868,5 [M+5H]^{5+}$, $723,9 [M+6H]^{6+}$, $602,7 [M+7H]^{7+}$, $543,2 [M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: $m/z = 4336,3 [M+H]^+$, $2168,6 [M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 17: $[G^{14}, U^{16} \rightarrow U^{21}]ADM(14-52)$



((2S,5S,11S,14S,19S)-19-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)-5-bencil-2-(3-guanidinopropil)-11-((R)-1-hidroxietil)-3,6,9,12,20-pentaoxo-1,4,7,10,13-pentaazacicloicosano-14-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{192}H_{301}N_{57}O_{57}$

Masa Exacta: 4317,241 Da

Peso Molecular: 4319,86 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo 17 en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue

de 2,6 mg (4,0 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **17** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4µm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 4 µm, 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min. R_t = 23,2 min, pureza ≥ 95 %.

Adicionalmente, una columna Jupiter® 5µm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 23,4 min, pureza ≥ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1080,9 $[M+4H]^{4+}$, 864,9 $[M+5H]^{5+}$, 721,0 $[M+6H]^{6+}$, 618,2 $[M+7H]^{7+}$, 540,9 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4318,4 $[M+H]^+$, 2159,7 $[M+2H]^{2+}$.

Análogos de Adrenomedulina Palmitoilados 23–25 con Miméticos de

Enlace Disulfuro

Síntesis:

La síntesis de los Ejemplos **23–25** se llevó a cabo utilizando síntesis automatizada de péptidos de la secuencia ADM(22–52) según lo descrito en el método general. Posteriormente, se incorporaron en forma manual las posiciones 21 a 14 y la palmitoilación. Ya se había mostrado la secuencia de acoplamiento de ADM(22–52) para los análogos con puente de lactama **3–11**, **19–22 y 26**.

Se utilizaron los compuestos **A**, **B** y **C** (mostrados anteriormente) como miméticos del enlace disulfuro. Se protegieron con Fmoc en el extremo N-terminal de la posición que reemplaza ADM-C²¹ y NAlloc, se protegieron con OAll en los extremos N- y C-terminales de la posición que reemplaza ADM-C¹⁶.

Se acoplaron los miméticos utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24h. La escisión de Fmoc se llevó a cabo utilizando piperidina al 20% en DMF (v/v) dos veces durante 5 min.

Posteriormente, el alargamiento de los aminoácidos 17–20 se llevó a cabo utilizando el método general descrito anteriormente. La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplos 23–25	AA de ADM humana
1.	Fmoc–Thr(tBu)–OH	20
2.	Fmoc–Gly–OH	19

3.	Fmoc-Phe-OH	18
4.	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	17

Luego de secar la resina a 40°C bajo vacío, se eliminaron los grupos protectores Alilo y Alloc utilizando un exceso molar de 1,5 veces de TPP-Pd en CHCl₃/AcOH/NMM (37:2:1, v/v/v, 1,5 mL). Se agitó la mezcla bajo atmósfera de Argón durante 2 h. Se lavó la resina dos veces durante 10 min cada vez con DIPEA al 0,5 % en DMF (v/v), DDTC al 0,5 % en DMF (p/p). Se logró la desprotección de Fmoc mediante tratamiento de la resina con piperidina al 30 % en DMF (v/v) dos veces durante 10 min.

La lactamización se llevó a cabo utilizando un exceso molar 15 veces superior de HOBt y un exceso molar 10 veces superior de DIC en DMF como solvente durante 6–8 h.

Se acoplaron los siguientes dos aminoácidos de los Ejemplos **23–25** en forma manual utilizando un exceso molar quintuplicado de aminoácido, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h. Se logró la desprotección de Fmoc después del primer acoplamiento mediante tratamiento de la resina con piperidina al 30 % en DMF (v/v) dos veces durante 10 min.

La secuencia de acoplamiento era la siguiente:

Ciclo de acoplamiento	Ejemplo 23	Ejemplo 24	Ejemplo 25	AA de ADM humana
1.	Fmoc-Gly-OH			15
2.	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Boc-Lys(Fmoc)-OH	14

Posteriormente, se eliminó el Fmoc del aminoácido N-terminal utilizando piperidina al 30 % en DMF (v/v) durante 10 min dos veces.

Se logró la palmitoilación del extremo N-terminal (Ejemplos **23** y **24**) o la cadena lateral de lisina libre (Ejemplo **25**) utilizando un exceso quintuplicado (75 μ mol) de ácido palmítico, HOBt y DIC en DMF como solvente durante aprox. 24 h.

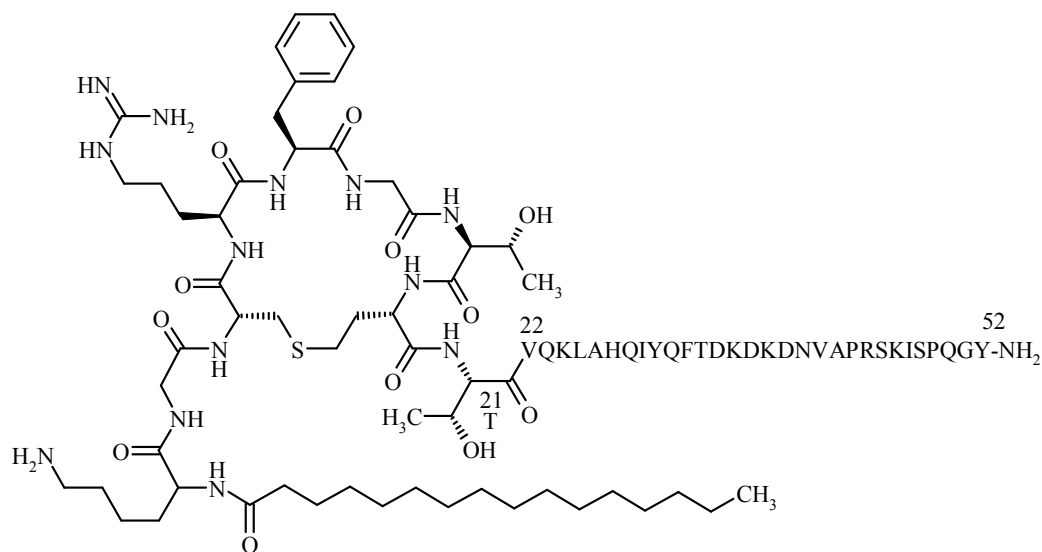
La escisión de los péptidos de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales se logró con TFA/TA/EDT (90:7:3, v/v/v) durante aprox. 3 h. Se precipitaron los péptidos y se lavaron con éter dietílico enfriado con hielo y posteriormente se liofilizaron.

La purificación del péptido crudo se llevó a cabo utilizando RP-HPLC preparativa en una columna C18 (Kinetex® 5 μ m XB-C18 100Å: 250 mm $\times$ 21,2 mm, 5 μ m). Se aplicó un gradiente lineal del 20 % al 60 % de eluyente B en A durante 60 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN). La velocidad de flujo era de 20 mL/min. Se midió la detección de UV a λ = 220 nm.

Analítica:

Se confirmó la identidad del péptido mediante MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y ESI-MS (HCT, Bruker). Se analizaron las purezas utilizando RP-HPLC analítica.

Ejemplo 23: PAM[G¹⁴, C¹⁶→U²¹]ADM(14–52)



((4S,7S,13S,16S,19R)–13–bencil–16–(3–guanidinopropil)–7–(hidroximetil)–
6,9,12,15,18–pentaoxo–19–(2–(2–palmitamidoacetamido)acetamido)–1–tia–
5,8,11,14,17–pentaazacicloicosano–4–carbonil)–L–treonil–ADM(22–52)

Fórmula Química: $C_{207}H_{329}N_{57}O_{58}S$

Masa Exacta: 4573,43 Da

Peso Molecular: 4576,31 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **23** en una escala de 15 μ mol. El rendimiento fue de 2,0 mg (2,9 % de teoría).

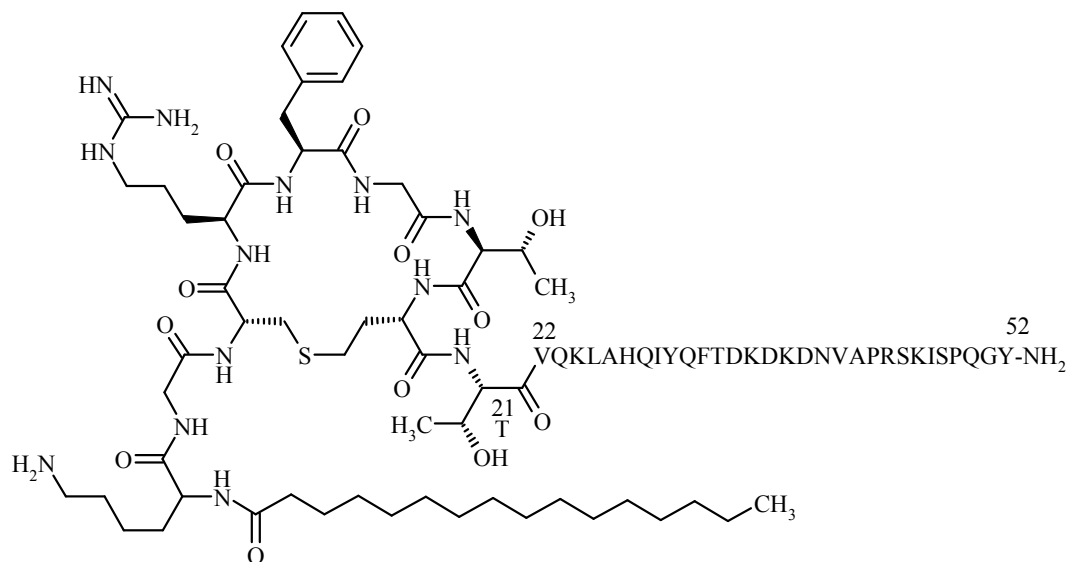
Se analizó el Ejemplo **23** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μ m Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μ m, 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 34,1 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del

10 % al 60 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 34,1 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 916,4 $[M+5H]^{5+}$, 763,7 $[M+6H]^{6+}$, 654,8 $[M+7H]^{7+}$; MALDI-TOF: m/z = 4574,9 $[M+H]^+$, 2287,1 $[M+2H]^{2+}$.

Ejemplo 24: PAM[K¹⁴, C¹⁶→U²¹]ADM(14–52)



((4S,7S,13S,16S,19R)-19-(2-(6-amino-2-palmitamido)hexanamido)acetamido)-13-bencil-16-(3-guanidinopropil)-7-((R)-1-hidroxietil)-6,9,12,15,18-pentaoxo-1-thia-5,8,11,14,17-pentaazacicloicosano-4-carbonil)-L-treonil-ADM(22–52)

Fórmula Química: C₂₁₁H₃₃₈N₅₈O₅₈S

Masa Exacta: 4644,50 Da

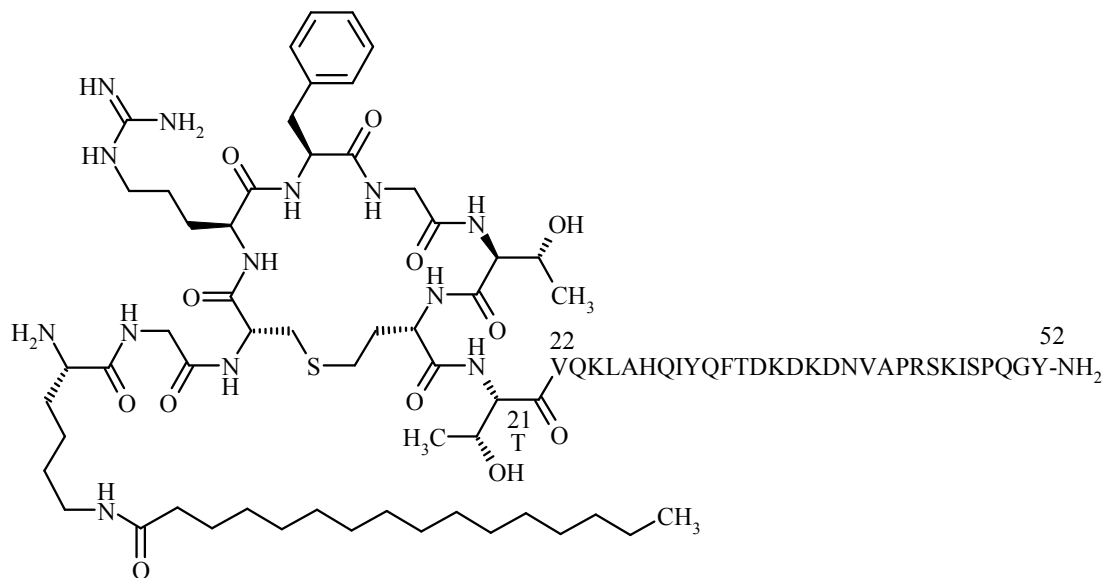
Peso Molecular: 4647,43 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **24** en una escala de 15 μmol . El rendimiento fue de 1,3 mg (1,9 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **24** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μm , 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 23,7 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μm C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm , 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 31,0 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1163,0 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 930,3 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 775,5 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 664,8 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 581,9 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4645,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2323,1 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Ejemplo 25: $[K^{14}(\text{PAM}), C^{16} \rightarrow U^{21}] \text{ADM}(14-52)$ 

((4S,7S,13S,16S,19R)-19-(2-((S)-2-amino-6-palmitamido-hexanamido)acetamido)-13-bencil-16-(3-guanidinopropil)-7-((R)-1-hidroxi-etil)-6,9,12,15,18-pentaoxo-1-tia-5,8,11,14,17-pentaazacicloicosano-4-carbonil)-L-treonil-ADM(22-52)

Fórmula Química: $C_{211}H_{338}N_{58}O_{58}S$

Masa Exacta: 4644,50 Da

Peso Molecular: 4647,43 g/mol

Se sintetizó el Ejemplo **25** en una escala de 15 μmol . El rendimiento fue de 2,0 mg (2,9 % de teoría).

Se analizó el Ejemplo **25** por medio de RP-HPLC analítica utilizando una columna Jupiter® 4 μm Proteo 90 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 4 μm , 90 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante

40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 24,4 min, pureza $\geq$ 95 %.

Adicionalmente, se utilizó una columna Jupiter® 5 μ m C18 300 Å (Phenomenex, 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m, 300 Å) aplicando un gradiente lineal del 20 % al 70 % de eluyente B en A durante 40 min (Eluyente A = TFA al 0,1% en agua; Eluyente B = TFA al 0,08% en ACN; velocidad de flujo = 0,6 mL/min; λ = 220 nm). R_t = 33,5 min, pureza $\geq$ 95 %.

La masa observada correspondía a la masa calculada. Trampa de Iones con fuente de ionización de electropulverización (ESI): m/z = 1162,7 $[M+4H]^{4+}$, 930,4 $[M+5H]^{5+}$, 775,6 $[M+6H]^{6+}$, 664,9 $[M+7H]^{7+}$, 581,9 $[M+8H]^{8+}$; MALDI-TOF: m/z = 4645,5 $[M+H]^+$, 2323,1 $[M+2H]^{2+}$.

B. Evaluación de actividad farmacológica

Se emplearon las siguientes abreviaturas [según las palabras en inglés]:

ACN	acetonitrilo
BALF	fluido de lavado broncoalveolar
BP	presión sanguínea arterial
CHO	Células de ovario de hámster chino
CO	gasto cardíaco
EC ₅₀	concentración efectiva máxima media
EVWLI	índice de agua pulmonar extravascular
FiO ₂	fracción inspirada de oxígeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

HEPES	ácido hidroxietil–piperazinaetanosulfónico
HR	frecuencia cardíaca arterial
HUVEC	células venosas umbilicales humanas
IBMX	3–Isobutil–1–metilxantina
i.v.	intravenosa
LPS	Lipopolisacárido
LVP	presión ventricular izquierda
OA	ácido oleico
PaO ₂	presión parcial de oxígeno en sangre arterial
<i>PAP</i>	presión arterial pulmonar
PEG	Polietilenglicol
s.c.	subcutánea
TAM	6–carboxitetrametilrodamina
TEER	resistencia eléctrica transendotelial
TFA	ácido trifluoroacético
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
<i>v/v</i>	<i>volumen/volumen</i>

Se puede demostrar la idoneidad de los compuestos de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades utilizando los siguientes sistemas de ensayos:

1) Descripciones de ensayos (*in vitro*)

1a) Ensayos en una célula reportera del receptor de adrenomedulina recombinante

Se cuantificó la actividad de los compuestos de acuerdo con la invención con la ayuda de una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) recombinante que porta el receptor de adrenomedulina humana. Se midió la activación del receptor mediante ligandos por aequorina luminiscente. La construcción de la línea celular y el procedimiento de medición han sido descritos en detalle [Wunder F., Rebmann A., Geerts A, y Kalthof B., *Mol Pharmacol*, 73, 1235–1243 (2008)]. Brevemente: se sembraron las células en placas opacas de microtítulo de 384 pocillos a una densidad de 4000 células/pocillo y se cultivaron durante 24 h. Después de la remoción del medio de cultivo, se cargaron las células durante 3 h con 0,6 µg/ml de coelenteracina en solución Tyrode libre de Ca^{2+} (cloruro sódico 130 mM, cloruro potásico 5 mM, HEPES (ácido 4–(2–hidroxietil)–1–piperazinaetanosulfónico) 20 mM, cloruro de magnesio 1 mM, e hidrógeno carbonato sódico 4,8 mM, pH 7,4) suplementado con 3–Isobutil–1–metilxantina (IBMX) 0,2 mM en un incubador de cultivo celular. Se agregaron los ejemplos durante 6 min en solución Tyrode libre de calcio²⁺ que contiene seroalbúmina bovina al 0,1%. Inmediatamente antes del agregado de calcio²⁺ a una concentración final de 3 mM se inició la medición de la luminiscencia con aequorina mediante el uso de un luminómetro adecuado. La luminiscencia se midió durante 60 s. En un experimento típico, se analizaron los compuestos en un rango de concentración de 1×10^{-13} a 3×10^{-6} M.

Los valores de EC₅₀ representativos para los ejemplos de las formas de realización se brindan en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Ejemplo No.	EC ₅₀ [nM]	Ejemplo No.	EC ₅₀ [nM]	Ejemplo No.	EC ₅₀ [nM]
1	20,5	11	34,0	21	> 1000
2	> 1000	12	0,81	22	15
3	49,6	13	> 1000	23	15
4	21,1	14	32,0	24	11
5	> 1000	15	0,07	25	24
6	> 1000	16	1,54	26	32
7	5,26	17	> 1000	27	56
8	17,3	18	22	ADM wt (tipo salvaje)	1,64
9	> 1000	19	> 1000		
10	19.6	20	27		

La EC₅₀ de ADM tipo salvaje está mayormente dentro del rango entre 0,5 nM y 2,5 nM.

1b) Ensayos de resistencia eléctrica transcelular en células endoteliales

Se caracteriza la actividad de los compuestos de acuerdo con la invención en ensayos de permeabilidad in vitro en células venosas umbilicales humanas (HUVEC, Lonza). Mediante el uso del aparato ECIS (ECIS: *Electric Cell-substrate Impedance Sensing* [Detección de Impedancia eléctrica célula-sustrato]; Applied Biophysics Inc; Troy, NY) se miden en forma continua los

cambios de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER, por sus siglas en inglés) en relación con una monocapa endotelial mediante el uso de un electrodo pequeño de oro en el cual se han sembrado las células. HUVEC se cultivan en las placas del electrodo sensor de 96 pocillos (96W1E, Ibidi GmbH, Martinsried) a monocapas confluentes y se puede inducir la hiperpermeabilidad mediante estímulos inflamatorios tales como Trombina, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, VEGF, Histamina y peróxido de hidrógeno los cuales han demostrado en su totalidad que causan la ruptura de los contactos de las células endoteliales y reducción de TEER. Se utiliza trombina en una concentración final de 0,5 U/ml. Se agregan los compuestos de ensayo antes o después de la adición de la trombina. En un experimento típico, se ensayan los compuestos en un rango de concentración de 1×10^{-10} a 1×10^{-6} M.

Las sustancias de acuerdo con la presente invención evitan la ruptura de la resistencia eléctrica de una monocapa de HUVEC después de la estimulación con dosis de trombina en forma dependiente en concentraciones de $> 1 \text{ nmol/L}$ [Figura 1].

1c) Ensayos de permeabilidad *in vitro* en células endoteliales

En otro modelo *in vitro* de hiperpermeabilidad endotelial, se examina la hiperpermeabilidad de los compuestos de acuerdo con la invención con respecto a la modulación de la permeabilidad macromolecular. Se cultivan células endoteliales de la venas umbilicales humanas (HUVECS) hasta confluencia sobre membranas de filtro Transwell® recubiertas con fibronectina (placas de 24 pocillos, insertos de 6,5 mm con membrana de policarbonato de $0,4 \mu\text{M}$; Costar #3413) que separan una cámara de cultivo tisular superior de la inferior con células endoteliales que crecen en el fondo de la cámara superior. El medio de la

cámara superior es suplementado con 250 µg/ml de FITC–Dextrano 40 kDa (Invitrogen, D1844). Se induce la hiperpermeabilidad de la monocapa mediante la adición de trombina hasta una concentración final de 0,5 U/ml. Se recolectan las muestras del medio de la cámara inferior cada 30 min y se mide la fluorescencia relativa como un parámetro para los cambios de la permeabilidad macromolecular con el transcurso del tiempo en un fluorómetro adecuado. La prueba con trombina induce casi una duplicación de la transición de FITC–dextrano a través de las monocapas endoteliales. En un experimento típico, se ensayan los compuestos en un rango de concentración de 1×10^{-10} a 1×10^{-6} M.

Las sustancias de acuerdo con la presente invención reducen la permeabilidad de una monocapa de HUVEC para FITC–Dextrano 40 kDa después de la estimulación con dosis de trombina en forma dependiente en concentraciones de $\geq 0,3$ nmol/L [Figura 2].

1d) Ensayo de cAMP

Abreviaturas [según las palabras en inglés]:

CFP	proteína fluorescente cian
CLR	receptor del tipo receptor de calcitonina
CRE	elemento de respuesta al cAMP
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DPBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco
ECFP	proteína fluorescente cian mejorada
EYFP	proteína fluorescente amarilla mejorada
FCS	suero de ternero fetal
RAMP2	proteína 2 modificadora de la actividad del receptor

Proveedores

DMEM	<i>Lonza</i>
DPBS	<i>Lonza</i>
FCS	<i>Biochrom</i>
Ham's F-12	<i>Fluka</i>
Metafectene ^R Pro	<i>Biontex</i>
ONE-Glo TM Sistema de Ensayo de Luciferasa	<i>Promega</i>
solución inicial de poli-D-Lisina- bromhidrato <i>0,1% en H₂O</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>

Cultivo celular

Se cultivaron células HEK-293 (células renales embriónicas humanas) en Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) que contenían FCS al 15% bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5% en frascos de cultivo celular de 75 cm².

Cotransfección transitoria de células HEK293

Se cultivaron células en frascos de 75 cm² hasta 70-80% de confluencia. Se diluyeron 45 µl de Metafectene^R Pro en 900 µl de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se disolvieron 9000 ng de plásmido que contenía ADN de CLR fusionado a EYFP y 3000 ng de plásmido que contenía ADN de RAMP2 fusionado a ECFP en 900 µl de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v). Se mezcló la solución de plásmido con la solución Metafectene^R Pro y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente.

Se eliminó el medio de las células y se reemplazó por 6 ml de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) que contenía FCS al 15%. Después de la adición de la solución de transfección, se incubaron las células durante 3 h bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5%.

Para la segunda transfección, se diluyeron 45 µl de Metafectene[®] Pro en 900 µl de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se disolvieron 12000 ng de plásmido pGL4.29[*luc2P*/CRE/Hygro] que contenía ADN para el gen reportero de la luciferasa *luc2P* (con la región promotora de CRE) en 900 µl Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v). Se mezcló la solución de plásmido con la solución Metafectene[®] Pro y se incubó durante 25 min a temperatura ambiente. Se eliminó el medio de las células y se reemplazó por 6 ml de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) que contenía FCS al 15%. Después de la adición de la solución para la transfección, se incubaron las células bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5% durante toda la noche.

Ensayo de cAMP

Sembrado de células transfectadas transitoriamente en placas de 96 pocillos

Para el recubrimiento de placas de 96 pocillos, se pipetearon en cada pocillo 50 µl de una solución de Poli-D-Lisina (1ml solución inicial de Poli-D-Lisina-bromhidrato/ 10 ml de DPBS) y se incubaron durante 40 min. Después de la eliminación de la Poli-D-Lisina, se lavó cada pocillo con 50 µl de DPBS. Se desprendieron las células transfectadas transitoriamente de los frascos de cultivo celular mediante la remoción del medio, lavando dos veces con 5 ml de DPBS y resuspendiendo en 13 ml de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) que contenía FCS al

15%. Se sembraron por cada pocillo de 90000 a 120000 células en 150 μ l de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) que contenía FCS al 15% y se incubaron las placas bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5% durante toda la noche.

Estimulación celular

Para cada ligando, se preparó una dilución seriada que proporcionó ocho concentraciones diferentes utilizando Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v). Antes de la estimulación, se reemplazó el medio en las células por 100 μ l de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) y se incubaron las placas durante 1 h bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5%. Para la estimulación, se eliminó el medio nuevamente y se incubaron las células durante 3 h en 80 μ l de solución de ligando bajo atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5%. Adicionalmente, se utilizaron 80 μ l de una solución de forskolina 5 μ M (en Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v)) como control positivo y 80 μ l de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) como control negativo. Se analizaron cada concentración y los controles por triplicado.

Medición de la luminiscencia

Después de 3 h de estimulación, se retiraron las soluciones y se lavaron las células con 50 μ l de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) por cada pocillo. Después de 10 min de incubación en 30 μ l de Ham's F-12/DMEM (1/1; v/v) a temperatura ambiente, se agregaron 30 μ l de solución de luciferasa (ONE-Glo™ Sistema de Ensayo con Luciferasa) y se midió directamente la luminiscencia utilizando un Infinite M200 (Tecan).

Análisis de datos

Se llevó a cabo un análisis de datos de la medición de la luminiscencia con GraphPad Prism 5. Por consiguiente, en primer lugar, se corrigieron los valores medidos de la luminiscencia de cada placa sobre la base del promedio

respectivo de la estimulación con forskolina. A continuación, se normalizaron a $[G^{14}]ADM(14-52)$ el cual se utilizó como péptido estándar en cada ensayo. Luego se analizaron los datos de corrección y normalización utilizando regresión no lineal proporcionando curvas de respuesta a la dosis para cada ligando ensayado.

Tabla 2: Resultados del ensayo de cAMP

Ejemplo No.	EC₅₀ [nM]	Ejemplo No.	EC₅₀ [nM]	Ejemplo No.	EC₅₀ [nM]
1	31	11	84	21	> 1000
2	> 1000	12	29	22	2,3
3	67	13	156	23	16,9
4	21	14	150	26	> 1000
5	112	15	3,3	27	3,4
6	303	16	6,8	ADM tipo salvaje	1,7
7	2,9	17	> 1000		
8	20	18	2,0		
9	> 1000	19	21.0		
10	41	20	9.1		

1e) Estabilidad en plasma de sangre humana

Se investigó la estabilidad de los péptidos utilizando análogos marcados

con 6-carboxitetrametilrodamina-(TAM) N-terminalmente.

Se prepararon análogos de ADM marcados fluorescentemente utilizando síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés) como se describió anteriormente (método general para la síntesis de péptidos). Se llevó a cabo el acoplamiento manual de 6-carboxitetrametilrodamina (TAM) al extremo N-terminal de los péptidos con un exceso molar triplicado del tinte fluorescente, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) en DMF bajo agitación constante durante 24 h de la resina según lo descrito recientemente (Böhme D., Beck-Sickinger A.G. ChemMedChem 2015, 10: 804–14). Se confirmó la identidad de los péptidos mediante espectrometría de masas con un MALDI-MS (UltraflexIII, Bruker) y un ESI-MS (HCT, Bruker). Las masas observadas correspondían a las masas calculadas. Se demostró las purezas de todos los análogos mediante RP-HPLC analítica y era de $\geq 90\%$.

Se disolvieron los péptidos en 1,5 ml de plasma de sangre humana hasta una concentración de $10E-5$ M y se incubaron a 37°C bajo agitación constante. Se precipitaron las muestras de 150 μl con 300 μl de Etanol/ACN (1:1) en distintos puntos de tiempo durante por lo menos 1 h a -20°C . Después de la centrifugación durante 30 seg. a 12000 rpm, se transfirió el sobrenadante a Filtros Tubo Centrífugos Costar® Spin-X® (0,22 μm) y se centrifugó durante 1 h a 12000 rpm. Se analizaron las muestras por RP-HPLC utilizando una columna de RPC Varian VariTide (tamaño de partícula 6 μm ; tamaño de poro 200 Å; 250x4,6 mm) con gradientes lineales de TFA al 0,1% en agua y TFA al 0,08% en ACN; se detectó la emisión de la fluorescencia a $\lambda = 573$ nm. Se determinó el porcentaje de péptido intacto mediante integración de picos. Se corrigieron los

valores de los picos que contenían fragmentos adicionales de escisión comparando las intensidades de los fragmentos de escisión y péptido intacto utilizando el análisis MALDI–MS (UltraflexIII, Bruker). Se calculó la estabilidad de los péptidos con GraphPad Prism 5 (Programa informático GraphPad) utilizando una función de decaimiento exponencial de dos fases para la determinación de las vidas medias en fase de decaimiento lento ($\ln(2)/K_{\text{slow}}$; K_{slow} : constante de velocidad de parte lenta del decaimiento exponencial) (Tabla 3 y Fig 3).

Tabla 3: **Estabilidad en plasma de sangre humana**

Ejemplo	Péptido	Vida Media (Lenta)
TAM–control	TAM[G ¹⁴]ADM(14–52)	9 h
TAM–18	TAM[K ¹⁴ (PAM), (Dpr ¹⁶ , E ²¹)lac]ADM(14–52)	> 96 h
TAM–27	TAM[K ¹⁴ (PAM), (Dpr ¹⁶ , E ²¹)lac, N _α –Me–K ⁴⁶]ADM(14–52)	> 96 h

1f) Ensayo de trans migración de granulocitos

Se siembran células endoteliales venosas umbilicales humanas de pasaje 2 (HUVEC, Lonza) en bandejas de filtro Transwell® (placas de 24 pocillos, insertos de 6,5 mm tamaño de poro 5 µm; Costar #3421, recubiertas con fibronectina, Sigma F–1141) a una densidad de 2×10^4 células por bandeja en medio de células endoteliales (EBM2, Lonza CC–3156, suplementado con suplementos de crecimiento, Lonza CC–4176) y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 36 horas. Se reemplaza el medio con medio EBM2 completo fresco que contenía factor alfa de necrosis tumoral (TNF–α, 0,5 nM) y se incuban las

células durante otras 7 horas. Posteriormente, se lavan las células en medio MAM (Medio 199 suplementado con FCS al 20% y HEPES 25 mM) y luego de la adición de los compuestos de ensayo a las bandejas, se incubaron adicionalmente durante 30 min. A continuación, se transfieren las bandejas a placas nuevas que contenían medio MAM con Interleuquina 8 (IL-8, 5 ng/ml). Se agregan granulocitos polimorfonucleares humanos (PMNs (por sus siglas en inglés), $3,7 \times 10^5$ células en 50 μ l) a los insertos. Después de 30 min, se determina la cantidad de células transmigradas en 500 μ l de medio de los pocillos mediante el uso de un contador de células CASY® TT (Roche Innovatis AG). IgG anti ICAM-1 (R&D Systems, BBA4) en una concentración de 100 μ g/ml sirve como control positivo.

Se aíslan recientemente granulocitos humanos (PMNs) de 15 ml de sangre EDTA de venas periféricas recolectada de voluntarios sanos luego de brindar su consentimiento informado. Brevemente: la sangre se coloca en capas sobre un gradiente de Histopaque™ 1077 / Histopaque™ 1119 (12 ml cada uno) y se recolectan PMNs después de la centrifugación durante 30 min a 2100 x rcf. Finalmente, se resuspenden PMNs en buffer MAM luego del lisado de los glóbulos rojos y diversas etapas de lavado.

En un experimento típico, se analizan los compuestos en un rango de concentración de 1×10^{-9} a 1×10^{-6} M.

Las sustancias de acuerdo con la presente invención redujeron la trans migración de PMNs a través de HUVECs estimuladas con TNF- α en concentraciones de ≥ 1 nmol/L [Figura 4]

2. Descripciones de ensayos (*in vivo*)

2a) Medición de la presión sanguínea y frecuencia cardíaca en

ratas Wistar normotensas, monitorizadas por telemetría

Se investigan los efectos cardiovasculares inducidos mediante los compuestos de acuerdo con la invención en ratas Wistar hembras conscientes con movimiento libre (peso corporal > 200 g) mediante medición radiotelemétrica de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca. Brevemente, el sistema telemétrico (DSI Data Science International, MN, USA) está compuesto por 3 elementos básicos: transmisores implantables (TA11PA-C40), receptores (RA1010) y un programa informático de adquisición basado en ordenador (Dataquest™ A.R.T. 4.1 para Windows). Las ratas son instrumentadas con implantes para la presión para uso crónico por lo menos 14 días antes de los experimentos. Se ata el catéter sensor con sutura 4-0 varias veces para producir un tapón 0,5 cm desde la punta del catéter. Durante la implantación del catéter, las ratas son anestesiadas con pentobarbital (Nembutal, Sanofi: 50 mg/kg i.p.). Luego de rasurar la piel abdominal, se realiza una incisión abdominal en la línea media, y se inserta el catéter sensor cargado con fluido corriente arriba en la aorta descendiente expuesta entre la bifurcación ilíaca y las arterias renales. Se ata el catéter varias veces en el tapón. La punta del catéter telemétrico se sitúa justo caudal a las arterias renales y se fija mediante adhesivo tisular. Se sujeta el cuerpo del transmisor a la pared peritoneal interna antes del cierre del abdomen. Se utiliza un cierre de dos capas de la incisión abdominal, con sutura individual del peritoneo y la pared muscular seguida por el cierre de la piel externa. Para la protección posquirúrgica contra infecciones y dolor, se inyecta una sola dosis de un antibiótico (Oxitetraciclina 10% R, 5,0 ml/kg s.c., beta-pharma GmbH&Co, Alemania) y analgésico (Rimadyl R, 5,0 ml/kg s.c., Pfizer, Alemania). La configuración del hardware está equipada para 24 animales. Cada jaula de ratas

es posicionada arriba de una plataforma de receptor individual. Después de la activación de los transmisores implantados, un sistema de adquisición de datos en línea recibe los datos y convierte las señales telemétricas de la presión en mm de Hg. Una referencia barométrica de la presión permite una relación de la presión absoluta (relativa al vacío) con la presión atmosférica del ambiente. El programa informático de adquisición de datos está predefinido para recibir datos hemodinámicos en intervalos de 10 s. cada 5 minutos. La recolección de datos para guardar es iniciada 2 horas antes de la administración de los compuestos de ensayo y se termina después de la compleción de ciclos de 24 h. En un experimento típico, los compuestos de ensayo son administrados como bolo ya sea por vía subcutánea o intravenosa en una dosis de 0,1 a 1000 µg/kg de peso corporal (como se hizo referencia al componente peptídico).

La adrenomedulina del tipo salvaje (Bachem, H-2932) induce una reducción de la presión sanguínea en este ensayo con una duración de ≤ 4 h cuando se analiza con dosis de ≤ 300 µg/kg de peso corporal [referencia WO 2013/064508 A1]. Las sustancias de acuerdo con la presente invención indujeron una reducción de la presión sanguínea de hasta 8 h en dosis de ≤ 200 µg/kg de peso corporal (en referencia al componente peptídico) [Figura 5].

2b) Ensayo de fuga vascular cutánea en ratas Wistar

Se emplea un ensayo intracutáneo de desafío con histamina para evaluar el efecto de los compuestos de acuerdo con la invención sobre la función de barrera vascular en animales sanos. Se anestesian ratas macho Sprague Dawley (peso corporal >200 g) con isoflurano (2%–3% en aire ambiente) y se colocan en posición supina. Se rasura el abdomen y se inserta un catéter en la vena femoral. Se administra vehículo solamente (0,5 ml de PBS + seroalbúmina

bovina al 0,1%) o los compuestos de ensayo en dosis apropiadas como inyecciones de bolo i.v. Después de 15 min, se administra una segunda inyección de 100 µl/kg de solución Evans blue al 2% (Sigma) e inmediatamente después, se inyectan 100 µl de soluciones de histamina de concentraciones apropiadas (por ejemplo 0 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 µg/ml) por vía intracutánea en la piel abdominal. Azul Evans es un tinte altamente unido a proteína plasmática y, por consiguiente, se utiliza como un indicador de extravasación de fluido rico en proteína y fuga vascular. 30 min después de este procedimiento, las ratas son sacrificadas mediante una sobredosis de isoflurano y posterior dislocación de cuello y se corta la piel abdominal. Se cortan las pápulas mediante el uso de un punzón para biopsia de 8 mm, se pesan las muestras de tejido y se transfieren a formamida durante 48 h a fin de extraer el azul Evans. Se miden las muestras a una longitud de onda de 620 nM y 750 nM en un fotómetro adecuado y se corrige el contenido de azul Evans de las muestras para pigmentos hemo de acuerdo con la fórmula $A_{620}(\text{corregido}) = A_{620} - (1.426 \times A_{750} + 0.030)$ y se calcula contra una curva estándar. [método adaptado de Wang L.F., Patel M., Razavi H.M., Weicker S., Joseph M.G., McCormack D.G., Mehta S., *Am. J. Respir Crit Care Med*, **165**(12), 1634–9 (2002)].

2c) Instilación intra-traqueal de LPS en ratones

Se emplea una prueba intratraqueal con lipopolisacárido (LPS) para examinar los efectos de los compuestos de acuerdo con la invención sobre la lesión pulmonar aguda. Se anestesian ratones macho BALB/c (peso promedio del animal 20–23 g) con isoflurano (7%) y se instila LPS de *E. coli* (por ejemplo, serotipo 055:B5; Sigma) en 100 µl de solución salina mediante el uso de una micropipeta. Las dosis típicas de LPS empleadas para la prueba están dentro del

rango entre 1 y 10 mg/kg de peso corporal. En puntos de tiempo diferentes, antes y después de la instilación, se administran los compuestos de ensayo por vía subcutánea. Las dosis típicas están dentro del rango entre 1 y 300 µg/kg de peso corporal. En este ensayo, los puntos de tiempo típicos de administración de los compuestos de ensayo son 15 min antes o 1 h después de la prueba con LPS. 48 horas después de la instilación de LPS, los ratones son profundamente anestesiados con isoflurano y sacrificados mediante dislocación de cuello. Después realizar la canulación del lavado de tráquea del espacio broncoalveolar con 0,5 ml de solución salina enfriada con hielo, se preparan y se pesan los pulmones. Se cuentan las células en el fluido del lavado broncoalveolar (BALF, por sus siglas en inglés) en un contador de células (Cell Dyn 3700, Abbott). En este ensayo, se ha encontrado de manera reproducible que el peso pulmonar como una medida del edema pulmonar ha aumentado en aproximadamente 50% o más con respecto a los controles sham (simulados) 48 horas después de la prueba con LPS. Como los pesos pulmonares muestran una variabilidad muy baja solamente en los grupos, se utiliza como parámetro el peso pulmonar absoluto. Siempre se ha encontrado que los recuentos de glóbulos blancos han aumentado significativamente con respecto al control en el BALF luego de la prueba con LPS.

2d) Inducción de daño pulmonar agudo en mini cerdos

Se induce el daño pulmonar agudo en mini cerdos anestesiados mediante el uso de lipopolisacárido (LPS) o ácido oleico como desafíos. En detalle: se mantienen anestesiados minicerdos hembra Göttingen con un peso corporal de aproximadamente 3,5 a 5,5 kg (Ellegaard, Dinamarca) mediante una infusión i.v. continua de Ketavet®, Dormicum® y Pancuronium® tras la

premedicación con una inyección intramuscular de Ketavet® / Stresnil®. Luego de la intubación intratraqueal, los animales son ventilados artificialmente utilizando un respirador pediátrico (Sulla 808V; Dräger, Alemania) con una mezcla de aire oxígeno en un volumen tidal de 30 a 50 ml y una frecuencia constante de 25 min⁻¹. Se regula PaCO₂ arterial hasta aproximadamente 40 mmHg regulando la fracción de oxígeno inspirado (FiO₂) mediante la relación de mezcla de aire oxígeno. Como rutina, se miden los siguientes parámetros cardiovasculares y respiratorios después de la colocación de sondas y catéteres necesarios adaptados a transductores de presión apropiados y equipos de registros: presión venosa central (por medio de la vena yugular izquierda), presión sanguínea arterial y frecuencia cardíaca (BP y HR (por sus siglas en inglés); por medio de la arteria carótida izquierda), presión ventricular izquierda (LVP (por sus siglas en inglés); utilizando un catéter Millar [FMI, Mod.:SPC-340S, REF: 800-2019-1, 4F] introducido en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha), presión arterial pulmonar (PAP; utilizando un catéter angiográfico con balón ARROW Berman [REF.: AI-07134 4 Fr. 50cm] colocado en la arteria pulmonar vía la vena yugular izquierda), gasto cardíaco (CO, por sus siglas en inglés) e índice de agua pulmonar extravascular (EVLWI (por sus siglas en inglés)) mediante el uso del sistema PiCCO (Pulsion, Alemania) conectado a un catéter de termodilución Pulsion 4F (PV2014L08N) colocado en la arteria femoral derecha. Los catéteres para la medición de CVP, BP, HR, LVP, y PAP son instalados en un sistema de registros Ponemah. Se realizan análisis de gases en sangre arterial para determinar el PaO₂/FiO₂. De acuerdo con la Conferencia Americana-Europea de Consenso sobre ARDS un PaO₂/FiO₂ < 300 mmHg es considerado como indicador de la presencia de daño pulmonar agudo.

Dependiendo del protocolo aplicado, la duración de los experimentos varía entre 4 y 5 horas después de la administración del desafío que induce el daño pulmonar. Al finalizar los experimentos, los cerdos son sacrificados mediante exanguinación y se recolecta el fluido del lavado broncoalveolar (BALF) de los pulmones. Se determina el contenido celular del BALF mediante el uso de un contador de células sanguíneas (Cell DYN 3700).

En una situación típica, se induce el daño pulmonar agudo mediante la instilación intratraqueal de Lipopolisacárido (LPS; *E.coli* 0111:B4; Sigma L2630) en solución salina en cada pulmón por medio del tubo endotraqueal. PAP y EVWLI aumentaron mientras que $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ disminuyó como respuesta al desafío. El contenido celular de BALF es aumentado significativamente.

En otro protocolo, se infunde i.v. ácido oleico (OA, por sus siglas en inglés; Sigma–Aldrich, O1008) diluido con etanol (1:1) durante 15 min a una dosis final de 100 mg/kg de peso corporal. El desafío con OA condujo a un aumento de PAP y EVLWI y disminución de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$.

C. Realizaciones ejemplares de composiciones farmacéuticas

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser convertidos en preparaciones farmacéuticas de las siguientes maneras:

solución i.v.:

Se disuelve un compuesto de acuerdo con la invención a una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un solvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo buffers de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro sódico, solución de glucosa 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). Se esteriliza la solución mediante filtración y se carga en envases para inyección estériles y libres de pirógenos.

solución s.c.:

Se disuelve un compuesto de acuerdo con la invención en una concentración por debajo de la solubilidad de saturación en un solvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo buffers de pH 4 a pH 7, solución isotónica de cloruro sódico, solución de glucosa al 5% y/o solución de PEG 400 al 30%). Se esteriliza la solución mediante filtración y se carga en envases para inyección estériles y libres de pirógenos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer Pharma Aktiengesellschaft

<120> Derivados de adrenomedulina estabilizados y utilización de los mismos

<130> BHC141036

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (E16,K21)lac]ADM(14-52)

<400> 1

Gly Gly Glu Arg Phe Gly Thr Lys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (K16,E21)lac]ADM(14-52)

<400> 2

Gly Gly Lys Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Dpr16, D21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<400> 3

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Asp Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (D16, Dab21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es ácido 2,4-diaminobutírico

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Dab: ácido 2,4-diaminobutírico

<400> 4

Gly Gly Asp Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Dab16, D21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es ácido 2,4-diaminobutírico

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dab: ácido 2,4-diaminobutírico

<400> 5

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Asp Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G14, (E16, Dpr21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<400> 6

Gly Gly Glu Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 7

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Dpr16, E21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<400> 7

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (D16, Orn21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Orn: Ornitina

<400> 8

Gly Gly Asp Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Orn16, D21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Orn: Ornitina

<400> 9

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Asp Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G14, (E16, Dab21)IacJADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Dab: ácido 2,4-diaminobutírico

<400> 10

Gly Gly Glu Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Dab16, E21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dab: ácido 2,4-diaminobutírico

<400> 11

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 12

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [K14(PAM), (E16,K21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Lys ácido palmítico

<400> 12

Xaa Gly Glu Arg Phe Gly Thr Lys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 13

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> K14(PAM), (K16,E21)Iac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Lys ácido palmítico

<400> 13

Xaa Gly Lys Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
 20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
 35

<210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> [K14(PAM), (E16, K21)lac, N-Me-I47]ADM(14-52)

<220>
 <221> Xaa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Lys ácido palmítico

<220>
 <221> Xaa
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa es N-Me-I: Isoleucina N-metilada

<400> 14

Xaa Gly Glu Arg Phe Gly Thr Lys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
 1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
 20 25 30

Lys Xaa Ser Pro Gln Gly Tyr
 35

<210> 15

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G14, (C16--U21)]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es U*

<400> 15

Gly Gly Cys Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 16

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G14, (U16--C21)]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es U*

<400> 16

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 17

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (U16--U21)]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es U*

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es U*

<400> 17

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 18

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [K14(PAM), (Dpr16, E21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Lys ácido palmítico

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<400> 18

Xaa Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 19

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (E16, Orn21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Orn: Ornitina

<400> 19

Gly Gly Glu Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (Orn16, E21)lac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Orn: Ornitina

<400> 20

Gly Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 21

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (K16, D21)Iac]ADM(14-52)

<400> 21

Gly Gly Lys Arg Phe Gly Thr Asp Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 22

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (D16, K21)lac]ADM(14-52)

<400> 22

Gly Gly Asp Arg Phe Gly Thr Lys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
35

<210> 23

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PAM[G14, (C16--U21)]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Gly ácido palmítico

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es U*

<400> 23

Xaa Gly Cys Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
 20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
 35

<210> 24
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> PAM[K14, (C16--U21)]ADM(14-52)

<220>
 <221> Xaa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es Lys ácido palmítico

<220>
 <221> Xaa
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa es U*

<400> 24

Xaa Gly Cys Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln
 1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser
 20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr
 35

<210> 25

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> K14(PAM), (C16--U21)]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Lys ácido palmítico

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es U*

<400> 25

Xaa Gly Cys Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 26

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> [G14, (D16, Dpr21)]ac]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<400> 26

Gly Gly Asp Arg Phe Gly Thr Xaa Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

20 25 30

Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

<210> 27

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> K14(PAM), (Dpr16, E21)lac, N-Me-K46]ADM(14-52)

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Lys ácido palmítico

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Dpr: ácido N-beta-4-metiltritol-L-diaminopropiónico

<220>

<221> Xaa

<222> (33)..(33)

<223> Xaa es N-Me-K: Lisina N-metilada

<400> 27

Xaa Gly Xaa Arg Phe Gly Thr Glu Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser

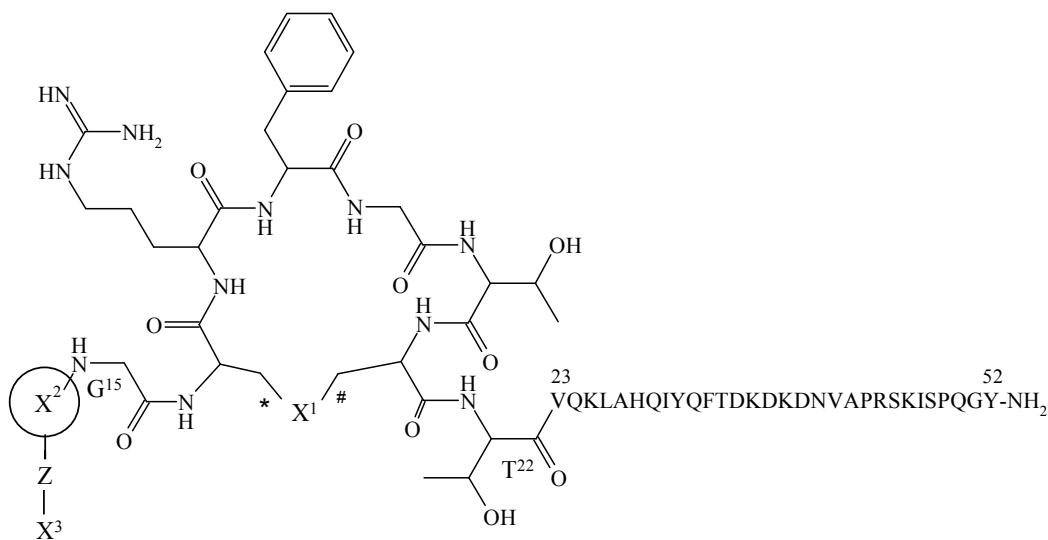
20 25 30

Xaa Ile Ser Pro Gln Gly Tyr

35

Reivindicaciones

1. Un compuesto de fórmula (I)



(I)

donde X¹ se selecciona del grupo que consiste en

-(CH₂)_{m1}-S-[#], donde m1 es 0-6; [#]-(CH₂)_{m2}-S-, donde m2 es 0-6;

*-(CH₂)_{m3}-[#], donde m3 es 1-8;

*-(CH₂)_{m4}-(CH₂=CH₂)-(CH₂)_{n1}-[#], donde m4 es 0-6, n1 es 0-6, con la condición de que m4+n1=0-6;

*-(CH₂)_{m5}-(CH≡CH)-(CH₂)_{n2}-[#], donde m5 es 0-6, y n2 es 0-6, con la condición de que m5+n2=0-6;

-(CH₂)_{m6}-CO-NH-(CH₂)_{n3}-[#], donde m6 es 0-4, y n3 es 0-4, con la condición de que m6+n3=0-6; [#]-(CH₂)_{m7}-CO-NH-(CH₂)_{n4}, donde m7 es 0-4, y n4 es 0-4, con la condición de que m7+n4=0-6;

$^*\text{--SO--(CH}_2\text{)}_{m8}\text{--}^\#$, donde m8 es 0–6; $^\#\text{--SO--(CH}_2\text{)}_{m9}\text{--}^*$, donde m9 es 0–6;

$^*\text{--SO}_2\text{--(CH}_2\text{)}_{m10}\text{--}^\#$, donde m10 es 0–6; $^\#\text{--SO}_2\text{--(CH}_2\text{)}_{m11}\text{--}^*$, donde m11 es 0–6;

$^*\text{--heteroarilo de 5–6 miembros--}^\#$;

$^*\text{--O--(CH}_2\text{)}_{m12}\text{--}^\#$, donde m12 es 0–6; $^\#\text{--O--(CH}_2\text{)}_{m13}\text{--}^*$, donde m13 es 0–6;

$^*\text{--CH}_2\text{--S--(CH}_2\text{)}_{m14}\text{--}^\#$, donde m14 es 0–6; $^\#\text{--CH}_2\text{--S--(CH}_2\text{)}_{m15}\text{--}^*$, donde m15 es 0–6;

$^*\text{--CH}_2\text{--O--(CH}_2\text{)}_{m16}\text{--}^\#$, donde m16 es 0–6; $^\#\text{--CH}_2\text{--O--(CH}_2\text{)}_{m17}\text{--}^*$, donde m17 es 0–6;

$^*\text{--(CH}_2\text{)}_{m18}\text{--NH--CO--CH}_2\text{--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n5}\text{--}^\#$, donde m18 es 0–3, y n5 es 0 o 1, con la condición de que $m18+n5= 0\text{--}3$; $^\#\text{--(CH}_2\text{)}_{m19}\text{--NH--CO--CH}_2\text{--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n6}\text{--}^*$, donde m19 es 0–3, y n6 es 0 o 1, con la condición de que $m19+n6= 0\text{--}3$;

$^*\text{--(CH}_2\text{)}_{m20}\text{--NH--CO--CH(CH}_3\text{)--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n7}\text{--}^\#$, donde m20 es 0–3, y n7 es 0 o 1, con la condición de que $m20+n7= 0\text{--}3$; $^\#\text{--(CH}_2\text{)}_{m21}\text{--NH--CO--CH(CH}_3\text{)--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n8}\text{--}^*$, donde m21 es 0–3, y n8 es 0 o 1, con la condición de que $m21+n8= 0\text{--}3$;

$^*\text{--(CH}_2\text{)}_{m22}\text{--NH--CO--CH(CH}_2\text{--C(CH}_3\text{)}_2\text{)--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n9}\text{--}^\#$, donde m22 es 0–3, y n9 es 0 o 1, con la condición de que $m22+n9= 0\text{--}3$; $^\#\text{--(CH}_2\text{)}_{m23}\text{--NH--CO--CH(CH}_2\text{--C(CH}_3\text{)}_2\text{)--NH--CO--(CH}_2\text{)}_{n10}\text{--}^*$, donde m23 es 0–3, y n10 es 0 o 1, con la condición de que $m23+n10= 0\text{--}3$;

$^*-(CH_2)_{m24}-NH-CO-CH(CH(CH_3)C_2H_5)-NH-CO-(CH_2)_{n11}-^{\#}$, donde $m24$ es 0–3, y $n11$ es 0 o 1, con la condición de que $m24+n11=0-3$; $^{\#}-(CH_2)_{m25}-NH-CO-CH(CH(CH_3)C_2H_5)-NH-CO-(CH_2)_{n12}-^*$, donde $m25$ es 0–3, y $n12$ es 0 o 1, con la condición de que $m25+n12=0-3$;

$^*-(CH_2)_{m26}-NH-CO-CH(CH_2(C_6H_5))-NH-CO-(CH_2)_{n13}-^{\#}$, donde $m26$ es 0–3, y $n13$ es 0 o 1, con la condición de que $m26+n13=0-3$; $^{\#}-(CH_2)_{m27}-NH-CO-CH(CH_2(C_6H_5))-NH-CO-(CH_2)_{n14}-^*$, donde $m27$ es 0–3, y $n14$ es 0 o 1, con la condición de que $m27+n14=0-3$;

$^*-(CH_2)_{m28}-NH-CO-(CH_2)_3-NH-CO-(CH_2)_{n15}-^{\#}$, donde $m28$ es 0 o 1, y $n15$ es 0 o 1, con la condición de que $m28+n15=0-1$; $^{\#}-(CH_2)_{m29}-NH-CO-(CH_2)_3-NH-CO-(CH_2)_{n16}-^*$, donde $m29$ es 0 o 1, y $n16$ es 0 o 1, con la condición de que $m29+n16=0-1$;

$^*-(CH_2)_{m30}-NH-CO-NH-(CH_2)_{n17}-^{\#}$, donde $m30$ es 0–5, y $n17$ es 0–5, con la condición de que $m30+n17=0-5$; $^{\#}-(CH_2)_{m31}-NH-CO-NH-(CH_2)_{n18}-^*$, donde $m31$ es 0–5, y $n18$ es 0–5, con la condición de que $m31+n18=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m32}-O-CO-NH-(CH_2)_{n19}-^{\#}$, donde $m32$ es 0–5, y $n19$ es 0–5, con la condición de que $m32+n19=0-5$; $^{\#}-(CH_2)_{m33}-O-CO-NH-(CH_2)_{n20}-^*$, donde $m33$ es 0–5, y $n20$ es 0–5, con la condición de que $m33+n20=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m34}-O-CO-O-(CH_2)_{n21}-^{\#}$, donde $m34$ es 0–5, y $n21$ es 0–5, con la condición de que $m34+n21=0-5$;

$^*-(CH_2)_{m35}-NH-CO-(CH_2)_{n22}-NH-(CH_2)_{p1}-$, donde $m35$ es 0–4, $n22$ es 0–4, y $p1$ es 0–4, con la condición de que $m35+n22+p1=0-4$; y

$^*-(CH_2)_{m36}-NH-CO-(CH=CH)-CO-NH-(CH_2)_{n23}-^{\#}$, donde $m36$ es 0–2, y $n23$ es 0–2, con la condición de que $m36+n23=0-2$;

donde * y $^{\#}$ reflejan donde X^1 está unido dentro de la estructura anular; y

X^2 está ausente, es hidrógeno, o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en G^{14} , K^{14} , F^{14} , SEC ID NO:1 [$Y^1RQSMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:2 [$R^2QSMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:3 [$Q^3SMNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:4 [$S^4MNNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:5 [$M^5NNFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:6 [$N^6NFQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:7 [$N^7FQGLRSF^{14}$], SEC ID NO:8 [$F^8QGLRSF^{14}$], SEC ID NO:9 [Q^9GLRSF^{14}], SEC ID NO:10 [$G^{10}LRSF^{14}$], SEC ID NO:11 [$L^{11}RSF^{14}$], SEC ID NO:12 [$R^{12}SF^{14}$], y SEC ID NO:13 [$S^{13}F^{14}$], el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} de la secuencia de aminoácidos de fórmula (I), donde cualquier aminoácido de X^2 puede ser reemplazado opcionalmente por un aminoácido natural o no natural;

donde A es L-Alanina; R es L-Arginina; N es L-Asparagina; D es ácido L-aspartico; Q es L-Glutamina; G es L-Glicina; H es L-Histidina; I es L-Isoleucina; L es L-Leucina; K es L-Lisina; M es L-Metionina; F es L-Fenilalanina; P es L-Prolina; S es L-Serina; T es L-Treonina; Y es L-Tirosina; V es L-Valina;

donde la numeración de aminoácidos en la fórmula (I) y en la definición de X^2 se refiere a la secuencia de ADM humana correspondiente;

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal o a un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 , al extremo N-terminal de G^{15} o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de cualquier aminoácido de X^2 o de G^{15} y X^3 o entre un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 y X^3

donde si X^3 está ausente, entonces

Z también está ausente y X^2 es hidrógeno o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos según lo definido anteriormente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces

X^2 está ausente o es un aminoácido o secuencia de aminoácidos según lo definido anteriormente; Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de cualquier aminoácido de X^2 o de G^{15} y X^3 o entre un grupo funcional de la cadena lateral de cualquier aminoácido de X^2 y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

2. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, donde X^1 se selecciona del grupo que consiste en

$^*-(\text{CH}_2)_{m1}-\text{S}^\#$, donde $m1$ es 0–6; $^\#-(\text{CH}_2)_{m2}-\text{S}^*$, donde $m2$ es 0–6;

$^*-(\text{CH}_2)_{m3}-^\#$, donde $m3$ es 1–8;

$^*-(\text{CH}_2)_{m6}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n3}-^\#$, donde $m6$ es 0–4, y $n3$ es 0–4, con la condición de que $m6+n3=0-6$; $^\#-(\text{CH}_2)_{m7}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n4}-^*$, donde $m7$ es 0–4, y $n4$ es 0–4, con la condición de que $m7+n4=0-6$;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} , o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

donde si X^3 está ausente, entonces Z también está ausente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

3. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde X^3 es un resto heterólogo seleccionado del grupo que consiste en un

polímero, una Fc, un ligando de unión al FcRh, albúmina y un ligando de unión a albúmina; y

X^1 , X^2 , y Z son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

4. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 3, donde X^3 es un polímero y el polímero se selecciona del grupo que consiste en ácidos carboxílicos C_3 – C_{100} lineales o ramificados, preferentemente ácidos carboxílicos C_4 – C_{30} , opcionalmente sustituidos con halo, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato, o fosfato, y los cuales pueden estar saturados, o mono- o di-insaturados, un resto PEG, un resto PPG, un resto PAS y un resto HES; y

X^1 , X^2 , y Z son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

5. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 4, donde el ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido behénico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido ceroplástico, ácido cerótico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido elaídico, ácido

enántico, ácido erúxico, ácido gédico, ácido henatriacontílico, ácido heneicosílico, ácido heptacosílico, ácido hexatriacontílico, ácido laceroico, ácido láurico, ácido lignocérico, ácido linoeláldico, ácido linoleico, ácido margárico, ácido melísico, ácido montánico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido nonacosílico, ácido nonadecílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido pantoténico, ácido pelargónico, ácido pentacosílico, ácido pentadecílico, ácido sílico, ácido sapiénico, ácido esteárico, ácido tricosílico, ácido tridecílico, ácido undecílico, ácido vaccénico, ácido valérico, ácido α -linolénico y los derivados de los mismos; y

X^1 , X^2 , y Z son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

6. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde Z está ausente y X^1 , X^2 , y X^3 son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

7. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde Z es un ligante escindible de acuerdo con lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y X^1 , X^2 , y X^3 son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

8. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el compuesto es adicionalmente modificado mediante N-metilación de por lo menos un enlace amida; y

X^1 , X^2 , X^3 , y Z son según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

9. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde

X^1 se selecciona del grupo que consiste en $^*-(CH_2)_{m1}-S-^{\#}$, donde $m1$ es 0-4; $^{\#}-(CH_2)_{m2}-S-^*$, donde $m2$ es 0-4; $^*-(CH_2)_{m6}-CO-NH-(CH_2)_{n3}-^{\#}$, donde $m6$ es 0-4, y $n3$ es 0-4, con la condición de que $m6+n3=0-6$;

X^2 es G^{14} o K^{14} , el cual está ligado covalentemente mediante un enlace amida al extremo N terminal G^{15} del compuesto de fórmula (I);

X^3 está ausente o es un resto heterólogo el cual está ligado covalentemente al extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} o a un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} , o a Z;

Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

donde si X^3 está ausente, entonces Z también está ausente;

donde si X^3 es un resto heterólogo, entonces Z está ausente o es un ligante escindible unido covalentemente entre el extremo N-terminal de G^{14} o K^{14} y X^3 , o entre un grupo funcional de la cadena lateral de K^{14} y X^3 ;

o una sal fisiológicamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal de los mismos.

10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para utilizar en un método para el tratamiento y/o prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.
11. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para utilizar en un método para el tratamiento y/o prevención de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca diastólica y sistólica (congestiva), enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular isquémico y/o hemorrágico, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad oclusiva arterial periférica, pre-eclampsia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, edema pulmonar agudo y/o crónico, alveolitis alérgica y/o neumonitis debido a la inhalación de partículas y polvo orgánico de origen fúngico, actinomicético u otro

origen, y/o bronquitis química aguda, edema pulmonar químico agudo y/o crónico, edema pulmonar neurogénico, manifestaciones pulmonares agudas y/o crónicas como consecuencia de la radiación, trastornos pulmonares intersticiales agudos y/o crónicos, daño pulmonar agudo/síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS) en adulto o niño incluyendo en el recién nacido, ALI/ARDS secundario a neumonía y sepsis, neumonía por aspiración y ALI/ARDS secundario a aspiración, ALI/ARDS secundario a inhalación de gases de humo, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión (TRALI), ALI/ARDS y/o insuficiencia pulmonar aguda luego de cirugía, traumatismo y/o quemaduras, y/o lesión pulmonar inducida por ventilador (VILI), lesión pulmonar tras aspiración de meconio, fibrosis pulmonar, mal de montaña, enfermedades renales crónicas, glomerulonefritis, lesión renal aguda, síndrome cardiorrenal, linfedema, enfermedad intestinal inflamatoria, sepsis, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) de origen no infeccioso, choque anafiláctico, enfermedad intestinal inflamatoria, urticaria y/o trastornos oculares edematosos o trastornos oculares asociados con función vascular alterada, incluyendo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética, en particular edema macular diabético (DME), edema subretiniano y edema intrarretiniano.

12. Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con un excipiente inerte, no tóxico, farmacéuticamente adecuado.

13. Un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en combinación con un ingrediente activo adicional seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de ACE, antagonistas de receptores de angiotensina, agonistas de receptores beta-2, inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE), agonistas de los receptores glucocorticoides, diuréticos, enzima 2 convertidora de angiotensina recombinante, ácido acetilsalicílico, péptidos natriuréticos y derivados de los mismos, e inhibidores de la neprilisina.
14. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para el tratamiento y/o prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.
15. Un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios en seres humanos o en animales que utiliza una cantidad eficaz de por lo menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un medicamento de acuerdo con lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.

DERIVADOS DE ADRENOMEDULINA ESTABILIZADOS Y UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS

RESUMEN

La invención se refiere a compuestos de Adrenomedulina (ADM) estabilizados, biológicamente activos, novedosos. La invención se refiere además a los compuestos para utilizar en un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, especialmente de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios, y se refiere a medicamentos que comprenden los compuestos para el tratamiento y/o prevención de trastornos cardiovasculares, edematosos y/o inflamatorios.