PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
46561-2413		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2018/017436	8 February 2018 (08-02-2018)	8 February 2017 (08-02-2017)
Applicant		
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/017436

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/017436

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/64 A61K38/22
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/237481 A1 (KRAYNOV VADIM [US] ET AL) 12 September 2013 (2013-09-12) Claims, Example 6, Figure 5, [0262], [284], [318],[319],[284] -----	1-22, 28-34, 36,53-75
X	US 2012/046229 A1 (KRAYNOV VADIM [US] ET AL) 23 February 2012 (2012-02-23) Claim 10, Example 9, [0151], [263] and Table 5. -----	1-22, 28-34, 36,53-75

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 April 2018	24/04/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gómez Ortiz, Mariola

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIAOYING CHEN ET AL: "Fusion protein linkers: Property, design and functionality", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 1 September 2012 (2012-09-01), XP055062583, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039 Items 5.3 and 5.5	23-54
A	RAKTIM KUMAR GHOSH ET AL: "Serelaxin in acute heart failure: Most recent update on clinical and preclinical evidence", CARDIOVASCULAR THERAPEUTICS, vol. 35, no. 1, 13 December 2016 (2016-12-13), pages 55-63, XP055464311, ISSN: 1755-5914, DOI: 10.1111/1755-5922.12231 the whole document	55-69
A	M. A. HOSSAIN ET AL: "The Minimal Active Structure of Human Relaxin-2", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 43, 28 October 2011 (2011-10-28), pages 37555-37565, XP055060937, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.282194 abstract	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/017436

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013237481 A1	12-09-2013	US 2013237481 A1	12-09-2013
		US 2017226178 A1	10-08-2017
US 2012046229 A1	23-02-2012	AU 2011291943 A1	07-03-2013
		BR 112013003522 A2	28-06-2016
		CA 2808596 A1	23-02-2012
		CL 2013000475 A1	10-01-2014
		CL 2014002493 A1	06-02-2015
		CN 103201285 A	10-07-2013
		CO 6680644 A2	31-05-2013
		EA 201390254 A1	30-08-2013
		EP 2605789 A2	26-06-2013
		JP 6054294 B2	27-12-2016
		JP 2013542715 A	28-11-2013
		KR 20130136450 A	12-12-2013
		MA 34521 B1	02-09-2013
		MX 346786 B	31-03-2017
		MY 162837 A	31-07-2017
		NZ 607069 A	31-10-2014
		PE 01602014 A1	08-02-2014
		SG 187736 A1	28-03-2013
		SG 10201506443T A	29-10-2015
		US 2012046229 A1	23-02-2012
		US 2014194357 A1	10-07-2014
		US 2017035897 A1	09-02-2017
		WO 2012024452 A2	23-02-2012

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2018/017436	08.02.2018	08.02.2017

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/64 A61K38/22

Applicant
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Gómez Ortiz, Mariola Telephone No. +49 89 2399-0

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2018/017436

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	23-27, 29-75
	No:	Claims	1-22, 28
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	23-27, 35, 37-52
	No:	Claims	1-22, 28-34, 36, 53-75
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-75
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1 US 2013/237481 A1 (KRAYNOV VADIM [US] ET AL) 12 September 2013 (2013-09-12)

D2 US 2012/046229 A1 (KRAYNOV VADIM [US] ET AL) 23 February 2012 (2012-02-23)

D3 XIAOYING CHEN ET AL: "Fusion protein linkers: Property, design and functionality",
ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, 1 September 2012 (2012-09-01), XP055062583,
ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039

The present application generally relates to modified relaxin polypeptides, such as modified human relaxin 2 polypeptides, comprising a non-naturally encoded amino acid which is linked to a pharmacokinetic enhancer, and therapeutic uses of such polypeptides, such as for the treatment of cardiovascular conditions (such as heart failure) and/or conditions relating to fibrosis.

Claim 1 is directed to a modified relaxin comprising a non-naturally encoded amino acid at certain positions of the chains A (SEQ ID NO:4) and/or B (SEQ ID NO:5/6) of the closed group listed in claim 1, wherein the non-naturally encoded amino acid is linked to a pharmacokinetic enhancer comprising a peptide components between 2 and 30 amino acids and a half-life extending moiety.

Claim 38 is directed to a modified relaxin of Formula III: AQ1-Relaxin..., wherein the modified para-acetyl-phenylalanine is located at the N-terminus of said relaxin A chain.

Claim 42 related to a modified relaxin comprising AQ1-GGGGS-Glugamms-C14-COOH as depicted in Formula III.

The working examples in the description show production and purification of mature relasin with pAcF at A chain residue 1 and conjugation of this one to PK enhancer comprising a peptide linked to a fatty acid. preparation of a number of similar pK enhancers. The intracellular cAMP assay was done with the compounds WT-RLX, RLX-AQ1 and RLX-BM25/AN1 (N at position 1 of chain A and pAcF in position 25 of chain B) conjugated to PK enhancers (Table 3). The in vivo PK data is summarised in Table 4.

D1 shows in [0284] FIG. 5 an SDS-PAGE gel of the prorelaxin produced by these methods with a chain B1 amino acid as Ala and a para-acetyl phenylalanine in the 13<th >amino acid position of the A chain, substituted for valine.

Example 6 demonstrates a method for the generation of a relaxin polypeptide that incorporates a ketone-containing non-naturally encoded amino acid that is subsequently reacted with an aminooxy-containing PEG of approximately 20,000 MW. Each of the residues before position 1 (i.e. at the N-terminus), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (i.e., at the carboxyl terminus of the protein of SEQ ID NO: 1 or the corresponding amino acids in SEQ ID NOs: 2 and 3), or any other position in a relaxin, relaxin variant, or prorelaxin containing said relaxin or relaxin variant, is separately substituted with a non-naturally encoded amino acid.

It appears that this document does not disclose a non-naturally amino acid linked to a peptide component of only 2 to 30 amino acids. However, since claim 1(c) is not clear (see item VIII) then the subject-matter of D1 which corresponds to the pro-relaxin with a non-naturally amino acid is considered as novelty destroying for claims 1-22, 28.

Fatty acids conjugated to the relaxin are as well disclosed therein (see [0194] and [0414]). [0414]: "In some embodiments, the relaxin polypeptide comprises one or more non-naturally encoded amino acids for glycosylation, acetylation, acylation, lipid-modification, palmitoylation, palmitate addition, phosphorylation, or glycolipid-linkage" .

Claim 29-34, 36, 53-75 are not novel or not inventive in view of D1: their features correspond to the common derivatives or to the medical uses associated with relaxin which are known in the art.

D2 discloses as well a relaxin polypeptide, wherein a non-naturally encoded amino acid is substituted at a position selected from the group consisting of residues before position 1 (i.e. at the N-terminus), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (see claim 10).

Paragraph [0151] reads: "An amino terminus modification group" refers to any molecule that can be attached to the amino terminus of a polypeptide. Similarly, a "carboxy terminus modification group" refers to any molecule that can be attached to the carboxy terminus of a polypeptide. Terminus modification groups include, but are not limited to, various water soluble polymers, peptides or proteins such as serum albumin, or other moieties that increase serum half-life of peptides".

In Example 9 (see as well [0263]) each of the residues before position 1 (i.e. at the N-terminus), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 (i.e., at the carboxyl terminus of the protein of SEQ ID NO: 1 or the corresponding positions in SEQ ID NOs: 2 and 3) is separately substituted with the non-naturally encoded amino acid pAcF and further introduction of PEG. The PK properties are analysed and the results are shown in Table 5.

For the same reasons exposed above D2 is novelty destroying for the subject-matter of claims 1-22 and 28.

Claim 29-34, 36, 53-75 are not novel or not inventive in view of D2: their features correspond to common derivatives or to the medical uses associated with relaxin which are known in the art.

Other prior art:

D3 is a review about fusion protein linkers and explains that besides the basic role in linking the functional domains together (as in flexible and rigid linkers) or releasing the free functional domain in vivo (as in in vivo cleavable linkers), linkers may offer many other advantages for the production of fusion proteins, such as improving biological activity, increasing expression yield, and achieving desirable pharmacokinetic profiles.

In items 5.3 and 5.5. the linkers used in the present application are defined as commonly used flexible linkers.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Claim 1 lacks clarity because the expression 1(c) is vague due to the use of unclear expressions such as "a pharmacokinetic enhancer" comprising a peptide component between 2 and 30 amino acids and a "half-life extending moiety". Both expressions in quotation marks are just a result to be achieve encompassing any compound which could fulfill the function meant including other peptides. In addition, the link between the non-naturally encoded amino acid and the PK enhancer is not defined: any length or nature are encompassed therein. As a consequence claim 1 encompasses the pro-relaxin protein with a non-naturally amino acid in one of the positions claimed which is then considered to be linked to a pharmacokinetic enhancer comprising 2 to 30 amino acids and a half-like extending moiety. In addition, the expression "comprising" does not exclude other peptides to be present in the enhancer. This lack of clarity affects as well the independent claim 70.

Claim 42 lacks clarity because the expression "AQ1" is not defined in this independent claim (Art. 6 PCT).

Claim 55-69 related to methods of treatment by therapy Rule 39.1(iv) PCT, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Claim 1 lacks support from the description (Art. 6 PCT): combinations of modified relasin polypeptide with non-naturally amino acids at 5 possible positions in chain A and 3 different ones in chin B are claimed. The description shows two different modified relaxins, at position 1 of chain A and at position 25 of chain B and with only one artificial amino acids namely p-AcF. It appears that the remaining mutants are not supported by the description because it is not guaranteed that they are conformationally stable and that they would fulfil the physiological function of the wild type.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
16 August 2018 (16.08.2018)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2018/148419 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/64 (2006.01) *A61K 38/22* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2018/017436

(22) International Filing Date:
08 February 2018 (08.02.2018)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/456,161 08 February 2017 (08.02.2017) US
62/627,411 07 February 2018 (07.02.2018) US

(71) Applicant: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 (US).

(72) Inventors: **DUBOWCHIK, Gene, M.**; 5 Research Parkway, Wallingford, Connecticut 06492 (US). **GUDMUNDSSON, Olafur, S.**; Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 (US). **HAN, Xiaojun**; 5 Research Parkway, Wallingford, Connecticut 06492 (US). **LAWRENCE, R., Michael**; 350 Carter Road, Hopewell, New Jersey 08540 (US). **LIPOVSEK, Dasa**; 100 Beaver Street, Waltham, Massachusetts 02453 (US). **MADSEN, Cort, S.**; 311 Pennington-Rocky Hill Road, Pennington, New Jersey 08543 (US). **MAPELLI, Claudio**; 465 Briggs Road, Langhorne, Pennsylvania 19047 (US). **MORIN, Paul, E.**; Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543 (US). **MYERS, Michael, C.**; 350 Carter Road, Hopewell, New Jersey 08540 (US).

(74) Agent: **TESKIN, Robin, L.** et al.; Leclair Ryan, P.C., Intellectual Property Department, 2318 Mill Road, Suite 1100, Alexandria, Virginia 22314 (US).

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

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

Declarations under Rule 4.17:
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*
— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2018/148419 A1

(54) Title: MODIFIED RELAXIN POLYPEPTIDES COMPRISING A PHARMACOKINETIC ENHANCER AND USES THEREOF

FIG. 1

WT-RLX	A-chain	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
	B-chain	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

(57) Abstract: The present disclosure generally relates to modified relaxin polypeptides, such as modified human relaxin 2 polypeptides, comprising a non-naturally encoded amino acid which is linked to a pharmacokinetic enhancer, and therapeutic uses of such polypeptides, such as for the treatment of cardiovascular conditions (such as heart failure) and/or conditions relating to fibrosis.

POLIPÉPTIDOS DE RELAXINA MODIFICADA QUE COMPRENDEN UN MEJORADOR FARMACOCINÉTICO Y SUS USOS

Campo de la Invención

En general, la presente invención se refiere a polipéptidos de relaxina modificada, tales como los polipéptidos de relaxina humana 2 modificada, que comprenden un mejorador farmacocinético, y los usos terapéuticos de tales polipéptidos, por ejemplo, para el tratamiento de afecciones cardiovasculares (tales como insuficiencia cardíaca) y/o afecciones relacionadas con la fibrosis. En modalidades ejemplares, el mejorador farmacocinético está ligado a un aminoácido cocodificado de manera no natural, que se puede incorporar ribosómicamente en el polipéptido de relaxina.

Antecedentes de la Invención

La insuficiencia cardíaca (HF) representa una enorme carga para el sistema de asistencia médica actual, con una prevalencia estimada de 5.8 millones en los Estados Unidos de América y más de 23 millones a nivel mundial (Roger et al., 2012. *Circulation*, 125(1): e2-e220). Los síntomas de HF son el resultado de un gasto cardíaco insuficiente y puede ser debilitante según cuán avanzado sea el estadio de la enfermedad. Los principales síntomas y signos de HF incluyen: 1) disnea (dificultad para respirar) como resultado del edema

pulmonar debido a un flujo anterógrado inefectiva del ventrículo izquierdo y el aumento de la presión en el lecho capilar pulmonar; 2) edema de miembros inferiores, que se presenta cuando el ventrículo derecho no logra llevar a cabo el retorno venoso sistémico; y 3) fatiga debido a la incapacidad del corazón para mantener el gasto cardíaco suficiente para cumplir con las necesidades metabólicas del cuerpo (Kemp & Conte, 2012. *Cardiovascular Pathology*, 21:365-371).

Muchas enfermedades contribuyentes, factores de riesgo y cambios patológicos pueden producir, en última instancia, la insuficiencia cardíaca (Jessup & Brozena, 2003. *N Engl J Med*, 348(20): 2007-2018). Los eventos perjudiciales que se consideran parte de la patofisiología de HF varían de las lesiones muy agudas, tales como el infarto de miocardio, a las más crónicas, tales como la hipertensión de por vida. La tasa de mortalidad permanece alta, ya que ~50 % de las personas con HF mueren dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico (Roger et al., 2012. *Circulation*, 125(1): e2-e220; Roger et al., 2004. *Jama*, 292(3): 344-50). La insuficiencia cardíaca claramente presenta una necesidad médica fundamental e insatisfecha.

La hormona relaxina humana 2 (también denominada relaxina H2) es un péptido de 6 kDa compuesto por 53 aminoácidos responsable de remodelar el aparato reproductor

antes del parto, lo que facilita el proceso de nacimiento. Si bien la relaxina es, principalmente, una hormona del embarazo, también se ha detectado en mujeres no embarazadas al igual que en hombres. La relaxina humana es un miembro de la familia de péptidos de insulina, que incluye insulina, varios péptidos similares a insulina (INSL3-6) y los factores de crecimiento similares a insulina (IGFI y IGFII) (Van Der Westhuizen et al., 2007. *Curr Drug Targets*, **8**(1): 91-104). Todos estos péptidos heterodiméricos están estructuralmente relacionados entre sí, en donde cada uno está compuesto por dos cadenas de péptidos (A & B), que están conectadas por dos enlaces disulfuro, y la cadena A contiene un solo enlace disulfuro intramolecular. El receptor para relaxina 2 (H2), denominado receptor 1 del péptido de la familia de relaxina (RXFP1), se mantiene entre ratón y ser humano con 85 % de identidad de aminoácidos y se expresa de manera esencialmente extendida en seres humanos y en otras especies (Halls et al., 2007. *Br J Pharmacol*, **150**(6): 677-91).

Durante la gestación humana, a fin de cumplir con las demandas nutricionales que le impone el feto, el cuerpo humano sufre una disminución considerable de ~30 % en la resistencia vascular sistémica (SVR) y un aumento concomitante de ~50 % en el gasto cardíaco (Jeyabalan, 2010: *Renal and Electrolyte Disorders.* Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Clapp and Capeless, 1997. *Am J Cardiol*,

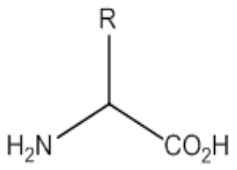
80(11): 1469-73). Otras adaptaciones vasculares incluyen un aumento de ~30 % en la distensibilidad arterial global, que es importante para mantener un acoplamiento ventricular-arterial efectiva, así como un aumento de ~50 % en el flujo sanguíneo renal (RBF) y la tasa de filtración glomerular (GFR), que son importantes para la supresión de desechos metabólicos (Jeyabalan, 2010: *Renal and Electrolyte Disorders.* Lippincott Williams & Wilkins. 462-518; Poppas et al., 1997. *Circulation*, **95**(10): p. 2407-15). Tanto los estudios preclínicos en roedores como los estudios clínicos realizados en diversas situaciones de pacientes proporcionan pruebas de que la relaxina está implicada, al menos en cierta medida, en la mediación de estos cambios fisiológicos de adaptación (Conrad, 2011. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,* 301(2), R267-275; Teichman et al., 2009. *Heart Fail Rev,* 14(4), 321-329.). Es probable que muchas de estas respuestas de adaptación beneficien a los pacientes con HF, dado que la fibrosis excesiva, la baja distensibilidad arterial y la insuficiencia renal son todas características comunes entre los pacientes con insufiencia cardíaca (Mohammed et al., 2015. *Circulation, 131*(6), 550-559), (Wohlfahrt et al., 2015. *Eur J Heart Fail, 17*(1), 27-34; Dammon et al., 2011. *Prog Cardiovasc Dis, 54*(2), 144-153). Debido a que alrededor de 30 % de los pacientes con HF padecen insuficiencia renal moderada a grave (Triposkiadis y

Skoularigis, 2012. *Curr Heart Fail Rep*, (4):354-62), un agente como relaxina, que mejora el flujo vascular y el tratamiento de electrolitos, puede ser particularmente beneficioso para los pacientes con HF.

El péptido relaxina tiene una semivida farmacocinética corta: Serelaxina, un péptido de relaxina humana recombinante, que se desarrolló para el tratamiento de HF, tiene una semivida farmacocinética corta de primera fase de 5-15 minutos, y exigió 48 horas de infusión intravenosa continua para tener utilidad terapéutica (REASANZ (serelaxin) Briefing Document Prepared by Novartis for FDA Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee Meeting. February 26, 2014). Para las enfermedades crónicas como la insuficiencia cardíaca, una molécula de relaxina con un perfil farmacocinético mejorado proporciona la oportunidad de tener mediantes alternativas de administración de fármacos, además de la infusión intravenosa continua, probablemente más confiables como tratamiento para los pacientes que tienen enfermedades crónicas.

Breve Descripción de la Invención

En la presente se proporcionan polipéptidos de relaxina modificada que comprenden un aminoácido codificado de manera no natural, en donde (a) el polipéptido de relaxina comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID

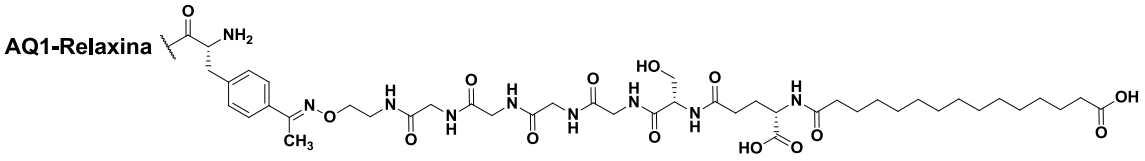
NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituido con un aminoácido codificado de manera no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: residuo 1 de la cadena A, residuo 2 de la cadena A, residuo 5 de la cadena A, residuo 13 de la cadena A, residuo 18 de la cadena A, residuo 5 de la cadena B, residuo 7 de la cadena B y residuo 25 de la cadena B, y que tienen opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos adicionales en la cadena A de relaxina y/o la cadena B de relaxina; (b) tal aminoácido codificado de manera no natural tiene la siguiente estructura: 

,

en donde el grupo R es cualquier sustituyente diferente de la cadena lateral que se encuentra en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina; y (c) el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un mejorador farmacocinético que comprende un componente peptídico de 2 a 30 aminoácidos y una porción de prolongación de semivida.

En la presente también se proporciona un polipéptido de relaxina modificada que comprende AQ1-GGGGS-Glu^{γ} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH que tiene la siguiente

estructura:



(Fórmula III),

En donde AQ1-relaxina comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de cadena B de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-fenilalanina modificada que se ilustra en la Fórmula III está ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina.

En la presente también se proporciona un polipéptido de relaxina modificada que comprende AQ1-relaxina-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, que tiene la estructura de la Fórmula III descrita en la presente, en donde AQ1-relaxina comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-fenilalanina modificada que se ilustra en la Fórmula III está ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina.

También se proporciona en la presente un polipéptido de relaxina modificada que comprende la

estructura que se muestra en la Figura 8.

También se proporciona en la presente un polipéptido de relaxina modificada que comprende la estructura que se muestra en la Figura 9.

En otro aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente y un portador aceptable farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente para el tratamiento de un trastorno asociado a relaxina y un portador aceptable farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada a relaxina que comprende administrar una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar una enfermedad cardiovascular que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar o aliviar un síntoma de insuficiencia cardíaca que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar una enfermedad asociada a la fibrosis, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para tratar o prevenir la insuficiencia renal, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para mejorar, estabilizar o restablecer la función renal en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una

composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para elaborar un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente, que comprende: (a) proporcionar un polipéptido que comprende la cadena A de relaxina y la cadena B de relaxina, en donde el polipéptido comprende el aminoácido codificado de manera no natural; y (b) unir el aminoácido codificado de manera no natural con el mejorador farmacocinético.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. Secuencia de un polipéptido de relaxina humana 2 sin un aminoácido codificado de manera no natural. Los polipéptidos de la cadena A (SEQ ID NO: 4) y la cadena B (SEQ ID NO: 6) están ligados mediante enlaces disulfuro como se ilustra en la Figura 5. La posición 1 en la cadena B se modifica con respecto a la cadena B del polipéptido de relaxina humana 2 (SEQ ID NO: 5) (la posición está subrayada, el ácido aspártico se sustituye con alanina como se muestra), que, según se observó, mejora la elaboración sin perjudicar considerablemente la potencia. En los ejemplos de trabajo en la presente, este polipéptido se denomina "de tipo silvestre" o WT-RLX.

Figura 2. Secuencia de RLX-AQ1 ("AQ1"), un polipéptido de relaxina humana 2 donde la posición 1 de la

cadena A se sustituye con un aminoácido codificado de manera no natural, para-acetil-fenilalanina (pAcF, subrayado). La cadena A (SEQ ID NO: 35) y la cadena B (SEQ ID NO: 6) están unidas mediante enlaces disulfuro en las posiciones que se ilustran en la Figura 5.

La Figura 3. Secuencia de RLX-BM25/AN1 ("BM25/AN1"), un polipéptido de relaxina humana 2 donde la posición 25 de la cadena B se sustituye con un aminoácido codificado de manera no natural, para-acetil-fenilalanina (pAcF, subrayado), y además, la posición 1 de la cadena A contiene la sustitución de glutamina con asparagina (subrayado). La cadena A (SEQ ID NO: 36) y la cadena B (SEQ ID NO: 37) están unidas mediante enlaces disulfuro en las posiciones que se ilustran en la Figura 5.

La Figura 4. Esquema de un polipéptido de preprorrelaxina para la expresión de RLX-AQ1. Un polipéptido de preprorrelaxina (SEQ ID NO: 38) se expresa en *E. coli* u otro sistema de expresióNo. Un aminoácido codificado de manera no natural, tal como pAcF, se puede incorporar ribosómicamente en la secuencia del polipéptido de preprorrelaxina, lo que facilita la unión posterior a un mejorador farmacocinético ("prolongador PK"). La secuencia líder específica para la expresión de *E. coli* se indica con círculos grises. El péptido C (péptido conector), derivado de la proinsulina con adición de sitios de escisión peptídica y

una sustitución de Lys con Gly, se indica mediante círculos negros. La secuencia líder y un péptido C se eliminan mediante escisión enzimática (los sitios de escisión se indican mediante flechas no etiquetadas). La sustitución de alanina en el residuo 1 de la cadena B ("B1") (presente en SEQ ID NO: 6) ayuda en la supresión de la secuencia líder. Se indica el residuo de pAcF para la unión específica de sitio al mejorador PK. Las cadenas A y B se alinean con la denominada RLN2 según nomenclatura HUGO y derivan del cADN de la variante 1 del transcripto de relaxina 2 (secuencia de referencia NM_134441).

La Figura 5. Ilustración estructural de RLX-AQ1 maduro que comprende una cadena A (SEQ ID NO: 36) y una cadena B (SEQ ID NO: 6), que está ligado, mediante un aminoácido codificado de manera no natural en la posición 1 de la cadena A, a un mejorador farmacocinético ("prolongador PK").

Figuras 6A-6B. Efectos de WT-RLX (Figura 6A) y AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH (Figura 6B) sobre los cambios en la expresión génica de alfa-actina del músculo liso en fibroblastos cardíacos humanos tratados con TGF-beta usando qRT-PCR para medir las concentraciones de mARNo. Lo números sobre las barras indican el porcentaje de reducción con respecto a TGF-beta solo con el vehículo establecido como valor inicial. Medias ± SEM; *P < 0.05. Veh = vehículo. nM =

nanomolar.

Figuras 7A-7D. Vacuolización epitelial de túbulos corticorrenales relacionada con PEG en ratas Sprague Dawley hembras. Riñón de ratas tratadas por mediante subcutánea (SQ) una vez por día con vehículo o análogos de relaxina. Los análogos de relaxina que contienen PEG (Figuras 7B y 7C) muestran vacuolización tubular cortical caracterizada por la presencia de vacuolos coalescentes grandes. No se observan vacuolos en los animales tratados con vehículo (Figura 7A) o con relaxina no pegilada (Figura 7D). Figura 7A: Vehículo (150 mM de Arg en 10 mM de amortiguador de citrato, pH 5,5) SQ durante 10 días. Figura 7B: AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH (1,5 kD de PEG) SQ a 40 mg/kg/día durante 7 días. Figura 7C: AQ1-20-kDa-PEG (20 kD de PEG) SQ a 15 mg/kg/día durante 10 días. Figura 7D: AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH SQ a 40 mg/kg durante 7 días. Magnificación 40×, H&E.

Figura 8. Estructura de AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH ilustrado en la Fórmula III.

Figura 9. Estructura de AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH ilustrado en la Fórmula III.

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

Como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia al plural, a menos que el

contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se mencionan "relaxina", "polipéptido de relaxina" o "polipéptido de relaxina modificada", se hace referencia a una o más de esas proteínas e incluyen equivalentes de estas conocidos por las personas de experiencia en la técnica, etcétera.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que le otorga habitualmente una persona experta en la técnica a quien pertenece esta inveniónNo.

Las expresiones "prolongador farmacocinético", "mejorador farmacocinético", "prolongador PK" y "mejorador PK" se usan de manera indistinta, y cada una hace referencia a una porción, un dominio o una molécula farmacéuticamente aceptable ligados de manera covalente ("conjugados" o "fusionados") al polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente, opcionalmente mediante un aminoácido codificado de manera no natural, que evita, retrasa o atenúa la degradación proteolítica *in vivo* u otra modificación química que reduzca la actividad del polipéptido de relaxina modificada, aumenta la semivida (semivida en suero y/o semivida terapéutica) y/o mejora o altera otras propiedades farmacocinéticas o biofísicas que incluyen, entre otras, aumentar la velocidad de absorción, reducir la toxicidad,

mejorar la solubilidad, reducir la agregación, aumentar la actividad biológica y/o la selectividad objetivo del polipéptido de relaxina modificada y/o reducir la inmunogenicidad del polipéptido de relaxina modificada, en comparación con un comparador, tal como una forma no conjugada del polipéptido de relaxina modificada o del polipéptido de relaxina de tipo silvestre. El mejorador PK descrito en la presente puede comprender un componente peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, y una porción de prolongación de semivida.

La expresión "porción de prolongación de semivida" hace referencia a una porción, un dominio o una molécula aceptables farmacéuticamente aceptable ligados de manera covalente ("conjugados" o "fusionados") con el polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente, por ejemplo, como un componente de un prolongador PK, opcionalmente mediante un aminoácido codificado de manera no natural, directamente o mediante un ligador (por ejemplo, un componente peptídico o PEG), que aumenta la semivida (semivida en suero y/o semivida terapéutica) y/o mejora o altera otras propiedades farmacocinéticas o biofísicas que incluyen, entre otras, aumentar la velocidad de absorción, reducir la toxicidad, mejorar la solubilidad, reducir la agregación, aumentar la actividad biológica y/o la selectividad objetivo del polipéptido de relaxina modificada,

aumentar la facilidad de elaboración y/o reducir la inmunogenicidad del polipéptido de relaxina modificada, en comparación con un comparador, tal como una forma no conjugada del polipéptido de relaxina modificada o del polipéptido de relaxina de tipo silvestre. La expresión "porción de prolongación de semivida" incluye, entre otras, porciones de prolongación de semivida no proteináceas, tales como un ácido graso o derivado de este, un polímero soluble en agua, tal como polietilenglicol (PEG) o PEG discreto, almidón de hidroxietilo (HES), un lípido, un grupo acilo ramificado o no ramificado, un grupo acilo C8-C30 ramificado o no ramificado, un grupo alquilo ramificado o no ramificado y un grupo alquilo C8-C30 ramificado o no ramificado; y porciones de prolongación de semivida proteináceas, tales como albúmina de suero, transferrina, adnectina (por ejemplo, adnectina de prolongación de farmacocinética (PKE) o de fijación a albúmina), dominio Fc y polipéptido no estructurado, tal como polipéptido XTEN y PAS (por ejemplo, secuencias de polipéptidos de conformación desordenada compuestas por los aminoácidos Pro, Ala y/o Ser), y un fragmento de cualquiera de las anteriores. Los términos "ligador" o "espaciador" pueden ser cualquier componente que une una porción de prolongación de semivida al polipéptido de relaxina modificada. Los ejemplos de ligadores incluyen, entre otros, compuestos orgánicos pequeños, polímeros soluble

en aguas de varias longitudes, tales como poli(etilenglicol) o polidextrano, y péptidos o polipéptidos, por ejemplo, de hasta 50. 40. 30. 25, 20. 15, 10 o hasta 6 aminoácidos de longitud.

La expresión "componente peptídico" hace referencia a un componente de un prolongador PK y comprende un péptido de hasta 50 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de componentes peptídicos incluyen, entre otros, péptidos de hasta 40. 30. 25, 20. 15, 10. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos de longitud. Tal componente peptídico puede unir de manera covalente una porción de prolongación de semivida con el polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente. En algunas modalidades, el componente peptídico puede comprender 2-50 aminoácidos. En algunas modalidades, el componente peptídico puede comprender 2-30 aminoácidos. En algunas modalidades, el componente peptídico puede comprender 3-20 aminoácidos. En algunas modalidades, el componente peptídico puede comprender 5-10 aminoácidos.

Las expresiones "estabilidad" o "estabilidad térmica" se refieren a la capacidad de un polipéptido para resistir el desplegamiento al calentarse. Generalmente, cuanto más alta es la estabilidad térmica de una molécula, más alta es la temperatura que se necesita para que el polipéptido se despliegue. Algunos ejemplos de métodos para determinar la estabilidad térmica de un polipéptido son la

calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la fluorescencia por barrido térmico. La estabilidad térmica se puede determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene mayor estabilidad térmica.

El término "agregación" se refiere a la tendencia de un polipéptido de formar complejos ligados de manera no covalente a otras moléculas (tales como otras moléculas del mismo polipéptido) y así formar complejos de alto peso molecular. Los ejemplos de métodos para medir la formación de agregados incluyen la cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Las cantidades relativas de agregación se pueden determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene menor agregaciónNo.

El término "desamidación" se refiere a la tendencia de los residuos de aminoácidos dentro de un polipéptido para experimentar la reacción de desamidación de manera espontánea, y así cambiar la estructura química del aminoácido y afectar potencialmente la función del polipéptido. Los ejemplos de métodos para medir la desamidación incluyen enfoque isoeléctrico capilar de imágenes (icIEF). La cantidad relativa de desamidación se puede determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene menor

desamidaciónNo.

La expresión "proteinólisis *in vivo*" se refiere a la escisión de un polipéptido cuando se introduce en un sistema viviente (por ejemplo, cuando se inyecta en un organismo), que puede ser el resultado de proteasas presentes en tal organismo. La proteinólisis puede afectar potencialmente la actividad biológica o la semivida de un polipéptido. Por ejemplo, la relaxina de tipo silvestre puede experimentar escisión, lo que da como resultado un polipéptido inactivo truncado. Un ejemplo de método para medir proteinólisis *in vivo* de relaxina es el ensayo de inmunoabsorción electroquimioluminiscente (ECLIA) basado en Meso Scale Discovery (MSD). La cantidad relativa de proteinólisis *in vivo* se puede determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene una reducción de proteinólisis *in vivo*.

El término "solubilidad" se refiere a la cantidad de una sustancia que se puede disolver en otra sustancia, por ejemplo, la cantidad de un polipéptido de relaxina modificada o no modificada que se puede disolver en una solución acuosa. Un ejemplo de método para medir la solubilidad de un polipéptido de relaxina modificada o no modificada es la prueba de solubilidad en flujo de tapóNo. La solubilidad relativa se puede determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que

tiene mayor solubilidad.

La expresión "actividad biológica" o "bioactividad" se refiere a la capacidad de una molécula para afectar cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, mediante, molécula o interacción en relación con un organismo, lo que incluye, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposón, prión, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. Por ejemplo, en el contexto de una relaxina modificada o no modificada, la actividad biológica incluye cualquiera de las funciones realizadas por relaxina. Por ejemplo, un polipéptido de relaxina modificada "biológicamente activo" puede presentar una o más de las actividades biológicas de relaxina de tipo silvestre, que incluyen, entre otras: activación de un receptor 2 de relaxina RXFP1 que incluye ortólogos de RXFP1 humanos y no humanos, activación de otro receptor de relaxina, tal como RXFP2, que incluye ortólogos humanos y no humanos, actividad antifibrótica *in vitro* o *in vivo*, eficacia en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca o una enfermedad fibrótica, ya sea en un animal humano, animal no humano y/o sistema modelo, y otras actividades biológicas descritas en la presente, por ejemplo, disminuir la resistencia vascular sistémica (SVR), aumentar el gasto cardíaco, aumentar la distensibilidad arterial global, aumentar el flujo sanguíneo renal (RBF) y/o la tasa de filtración glomerular (GFR). Los ejemplos de

métodos para determinar si una molécula tiene al menos una actividad biológica de relaxina de tipo silvestre (tal como el polipéptido de relaxina de tipo silvestre de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) pueden incluir los ensayos de actividad *in vitro* o ensayos de fijación al receptor, por ejemplo, el ensayo de acumulación de cAMP intracelular. El nivel relativo de actividad biológica se puede determinar con respecto a un compuesto comparador, por ejemplo, para identificar un polipéptido que tiene actividad biológica o que tiene actividad biológica lo suficientemente alta para un uso terapéutico deseado, por ejemplo, que tiene un EC50 menos de 5 veces, menos de 10 veces, menos de 20 veces, menos de 50 veces o menos de 100 veces mayor que el EC50 de un comparador, en un ensayo de actividad *in vitro* o *in vivo*.

El compuesto comparador descrito en la presente puede ser otra secuencia que no tenga una modificación, tal como una modificación descrita en la presente. Por ejemplo, el compuesto comparador puede ser la misma secuencia del polipéptido de relaxina modificada sin enlace a un prolongador PK. Los ejemplos de compuestos comparadores incluyen, entre otros, el polipéptido de relaxina de tipo silvestre de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, un polipéptido de relaxina modificada de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, un polipéptido de relaxina modificada de SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 6, un polipéptido de relaxina modificada de SEQ ID NO: 35

y SEQ ID NO: 6, u otro compuesto comparador. En algunas modalidades, el compuesto comparador puede contener al menos un aminoácido codificado de manera no natural, que puede estar ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa, péptido, polipéptido o porción de prolongación de semivida descritos en la presente (por ejemplo, PEG o un ácido graso). En algunas modalidades, un compuesto comparador puede contener al menos un aminoácido codificado de manera no natural, que puede estar o no ligado a un ligador, polímero, molécula biológicamente activa, péptido, polipéptido o porción de prolongación de semivida descritos en la presente. En algunas modalidades, un compuesto comparador puede contener sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos adicionales. En algunas modalidades, la comparación se puede realizar con una forma acilada o no acilada del polipéptido; en el caso anterior, la comparación se puede realizar con un polipéptido que comprende o no comprende un aminoácido codificado de manera no natural.

El término "correspondiente" se refiere a una posición ("posición correspondiente") o región ("región correspondiente") dentro de una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que se identifica mediante la comparación con una secuencia de referencia. La secuencia de referencia puede ser una secuencia de tipo silvestre o no modificada, tal como el polipéptido de relaxina de tipo silvestre de SEQ ID NO: 4

y SEQ ID NO: 5. Una posición o región correspondientes se pueden identificar mediante la alineación de la secuencia con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la "posición correspondiente al aminoácido 1 en la cadena A de relaxina" se refiere a la posición en la secuencia que está en la misma columna de alineación que el aminoácido 1 en SEQ ID NO: 4 cuando esta secuencia está alineada con SEQ ID NO: 4. En la alineación, el aminoácido o nucleótido pueden o no coincidir con el aminoácido o nucleótido en la posición correspondiente en la secuencia de referencia.

La alineación usada para identificar una posición correspondiente o una región correspondiente se puede proporcionar usando un algoritmo de alineación convencional, tal como Blast (Altschul et al., J Mol Biol. 5 de octubre de 1990;215(3):403-10), Smith-Waterman (Smith y Waterman, J Mol Biol., 25 de marzo de 1981;147(1):195-7) o Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, J Mol Biol., marzo de 1970;48(3):443-53). El algoritmo de Needleman-Wunsch se puede usar para proporcionar la alineación global con calificación más alta (es decir, una alineación que contenga cada residuo en ambas secuencias, a pesar de que una alineación pueda comenzar y/o terminar en los espacios). Ya sea que se utilice Blast, Smith-Waterman o Needleman-Wunsch, la alineación con calificación más alta se puede identificar usando parámetros "predeterminados", tal como el uso de la matriz de

calificación BLOSUM62, una penalidad de apertura de espacios de 11, y una penalidad de extensión de espacio de 1, y (cuando se usa Blast para la alineación de pares) un tamaño de palabra de 3.

La expresión "enfermedad asociada a la fibrosis" incluye enfermedades, trastornos y afecciones en los cuales se observó que la fibrosis se presentó o en los cuales se sabe o se cree que la fibrosis está asociada o contribuye a la etiología, progresión y los síntomas de enfermedad, o en los cuales se sabe o se cree que la fibrosis se presenta a medida que la enfermedad avanza. La fibrosis puede afectar un órgano o tejido, tal como páncreas, pulmón, corazón, riñón, hígado, ojos, sistema nervioso, médula ósea, ganglios linfáticos, endomiocardio o retroperitoneo. Algunos ejemplos de enfermedades asociadas a la fibrosis incluyen, entre otros, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis hepática, precirrosis, cirrosis, enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, fibrosis quística, fibrosis pulmonar o de pulmón, fibrosis masiva progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis por inyección, fibrosis renal o de riñón, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefropatía por IgA, mielofibrosis, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca metabólica, fibrosis cardíaca, fibrosis por cataratas, cataratas, cicatrización ocular, fibrosis

pancreática, fibrosis dérmica, fibrosis intestinal, estenosis intestinal, fibrosis endomiocárdica, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, enfermedad de Crohn, fibrosis retroperitoneal, queloide, fibrosis sistémica nefrogénica, escleroderma, esclerosis sistémica, artrofibrosis, síndrome de Peyronie, contractura de Dupuytren, neuropatía diabética, capsulitis adhesiva, enfermedad hepática alcohólica, hepatoesteatosis, hepatitis viral, enfermedad biliar, hemocromatosis primaria, cirrosis relacionada con los fármacos, cirrosis criptógena, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar fibrótica humana, degeneración macular, retinopatía retinal, retinopatía vítrea, fibrosis miocárdica, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, ateroesclerosis/reestenosis, cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática y enfermedad intestinal inflamatoria (que incluye, entre otras, colitis colagenosa). En algunas modalidades, la enfermedad asociada a la fibrosis puede incluir fibrosis hepática, fibrosis renal o de riñón, fibrosis pulmonar o de pulmón y fibrosis cardíaca o del corazóNo. En algunas modalidades, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser fibrosis hepática. En algunas modalidades, la enfermedad asociada a la fibrosis puede ser NASH.

La expresión “sustancialmente purificado” se

refiere a un polipéptido de relaxina modificada o no modificada que puede ser sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con la proteína tal como se encuentra en la naturaleza, es decir, una célula nativa, o una célula hospedera en el caso de polipéptidos de relaxina modificada o no modificada producidos de manera recombinante. El polipéptido de relaxina modificada o no modificada que puede ser sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de alrededor de 30 %, menos de alrededor de 25%, menos de alrededor de 20%, menos de alrededor de 15%, menos de alrededor de 10%, menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3%, menos de alrededor de 2%, o menos de alrededor de l % (en peso seco o húmedo) de proteína contaminante. Por lo tanto, el polipéptido de relaxina modificada o no modificada "sustancialmente purificado" producido por los métodos de la presente descripción puede tener un nivel de pureza de al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 35 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 45 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 55 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 65 %, al menos alrededor de 70 %, específicamente, un nivel de pureza de al menos alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, y más específicamente, un nivel de pureza de al menos alrededor de 90 %, un nivel de

pureza de al menos alrededor de 95 %, un nivel de pureza de al menos alrededor de 99 % o más, según se determine mediante los métodos adecuados, tales como análisis SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

Una "célula hospedera recombinante" o "célula hospedera" se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, independientemente del método usado para la inserción, por ejemplo, absorción directa, transducción, apareamiento f u otros métodos conocidos en el estado de la técnica para crear células hospedera recombinantes. El polinucleótido exógeno se puede mantener como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o de manera alternativa, puede estar integrado en el genoma hospedera.

Como se usa en la presente, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya, tales como animales (que incluyen, entre otros, mamíferos, insectos, reptil, aves, etc.), ciliatos, plantas (que incluyen, entre otras, monocotiledóneas, dicotiledóneas, algas, etc.), hongos, levaduras, flagelados, microsporidia, protistas, etc.

Como se usa en la presente, la expresión "no eucariota" se refiere a organismos no eucariotas o procariotas. Por ejemplo, un organismo no eucariota puede pertenecer al dominio filogenético Eubacteria (que incluye,

entre otros, *Escherichia coli, Thermus thermophilus, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida,* etc.) o al dominio filogenético Archaea (que incluye, entre otros, *Methanococcus jannaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Halobacterium, tal como Haloferax volcanii y especie de Halobacterium NRC-1, Archaeoglobus fulgidus, Pyrococcus furiosus, Pyrococcus horikoshii, Aeuropyrum pernix*, etc.).

Como se usa en la presente, el término "medio" incluye cualquier medio de cultivo, solución, sólido, semisólido o soporte rígido que pueda soportar o contener cualquier célula hospedera, lo que incluye células hospedera bacterianas, células hospedera de levadura, células hospedera de insectos, células hospedera vegetales, células hospedera eucariotas, células hospedera de mamíferos, células CHO, células hospedera procariotas o células hospedera de *E. coli* y *Pseudomonas*, y contenidos celulares. Por lo tanto, el término puede abarcar el medio en el cual se cultivó la célula hospedera, por ejemplo, el medio en el cual se secretó el polipéptido de relaxina modificada o no modificada, que incluye el medio antes o después de una etapa de proliferacióNo. El término también puede abarcar amortiguadores o reactivos que contienen lisados de células hospedera, tal como cuando el polipéptido de relaxina modificada o no modificada se produce de manera intracelular

y las células hospedera son lisadas o alteradas para que liberen el polipéptido de relaxina modificada o no modificada.

El término "relaxina", como se usa en la presente, se refiere a la relaxina humana, específicamente, la relaxina humana 2 (también denominada relaxina H2 o RLN2), a menos que el contexto indique lo contrario, cuya secuencia de aminoácidos y estructura espacial son conocidas. La relaxina humana está compuesta por una cadena A de 24 aminoácidos y una cadena B de 29 aminoácidos que se reticulan mediante enlaces disulfuro (véase la Figura 5). Una relaxina de tipo silvestre reticulada de manera adecuada contiene tres puentes disulfuro: uno entre la posición 11 de la cadena A y la posición 11 de la cadena B, un segundo entre la posición 24 de la cadena A y la posición 23 de la cadena B, y un tercero entre las posiciones 10 y 15 de la cadena A.

Como se usa en la presente, "polipéptido de relaxina modificada" o "relaxina modificada" se usan de manera indistinta e incluyen aquellos polipéptidos y proteínas que son diferentes de la relaxina de tipo silvestre (por ejemplo, la relaxina humana de tipo silvestre de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5) y, en general, tienen al menos una actividad biológica de una relaxina 2, así como análogos de relaxina, isoformas de relaxina, miméticos de relaxina, polimorfismos (por ejemplo, variantes de la secuencia de

relaxina natural), fragmentos de relaxina, proteínas híbridas de relaxina, proteínas de fusión, oligómeros y multímeros, homólogos, variantes del patrón de glucosilación, variantes de empalme y muteínas de aquella. Las expresiones "polipéptido de relaxina modificada" y "relaxina modificada" abarcan polipéptidos de relaxina que comprenden una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos.

Las sustituciones en una amplia variedad de posiciones de aminoácidos en la relaxina natural se pueden incorporar en un polipéptido de relaxina modificada. Las sustituciones que incluyen, entre otras, las que modulan la solubilidad o estabilidad, aumentan la actividad agonista, aumentan la semivida *in vivo* o *in vitro*, aumentan la resistencia a la proteasa, reducen la inmunogenicidad o la toxicidad, facilitan la purificación o la facilidad de fabricación, etc. y están comprendidas en la expresión "polipéptido de relaxina modificada" o "relaxina modificada". En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos codificados de manera no natural descritas en la presente se pueden combinar con otras adiciones, sustituciones o supresiones dentro del polipéptido de relaxina modificada para afectar los rasgos biológicos del polipéptido de relaxina modificada con respecto a otro polipéptido de relaxina (por ejemplo, el polipéptido de relaxina de tipo silvestre de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 u otro polipéptido

de relaxina, tal como el mismo polipéptido de relaxina sin la adición, sustitución o supresión, u otro polipéptido modificado o no modificado de relaxina modificada o no modificada). En algunas modalidades, las otras adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la estabilidad (que incluye, entre otros, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido de relaxina modificada o aumentar la afinidad del polipéptido de relaxina modificada hacia su receptor. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la estabilidad farmacéutica del polipéptido de relaxina modificada. En algunas modalidades, las otras adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la solubilidad (por ejemplo, cuando se expresa en *E. coli* o en otras células hospedera), aumentar la facilidad de elaboración o disminuir la agregación del polipéptido de relaxina modificada. En algunas modalidades, las adiciones, sustituciones o supresiones pueden aumentar la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli* o en otras células hospedera recombinantes. En algunas modalidades, se pueden seleccionar sitios para sustitución con un aminoácido no natural o codificado de manera natural, además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural que da como resultado una mayor solubilidad de un polipéptido después de la expresión en *E. coli* o en otras células hospedera

recombinantes.

En algunas modalidades, los polipéptidos de relaxina modificada también comprenden una inserción, sustitución o supresión adicional que modula la actividad biológica del polipéptido de relaxina modificada. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o supresiones pueden modular una o más propiedades o actividades de relaxina modificada. Por ejemplo, las adiciones, sustituciones o supresiones pueden modular la afinidad al receptor del polipéptido de relaxina, las proteínas de fijación o el ligando asociado, modular la transducción de señal después de la fijación al receptor de relaxina, modular la semivida *in vivo* o en circulación, modular la semivida terapéutica, modular la estabilidad del polipéptido, modular la escisión mediante proteasas, modular la dosis, modular la liberación o biodisponibilidad, facilitar la purificación, disminuir la desamidación, disminuir la agregación, mejorar la vida útil o la semivida *in vitro*, o mejorar o alterar una mediante de administración particular. De manera similar, los polipéptidos de relaxina modificada pueden comprender secuencias de escisión de proteasa, grupos reactivos, dominios de fijación al anticuerpo (que incluyen, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (que incluyen, entre otras, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas ligadas (que incluyen, entre otras,

biotina) que mejoran la detección (que incluyen, entre otras, GFP), la purificación u otros rasgos del polipéptido.

La expresión "polipéptido de relaxina modificada" también incluye fragmentos biológicamente activos, variantes biológicamente activas y estereoisómeros de la relaxina natural, además de variantes agonistas, miméticas y antagonistas de la relaxina natural y las fusiones de polipéptidos de estos. Las fusiones que comprenden aminoácidos adicionales en el amino-terminal, carboxi-terminal o ambos están comprendidas en la expresión "polipéptido de relaxina modificada". Los ejemplos de fusiones incluyen, por ejemplo, relaxina de metionilo, en donde una metionina está ligada al N-terminal de una cadena A y/o una cadena B de relaxina, que resulta de la expresión recombinante de la forma madura de relaxina que carece del péptido líder o péptido de señal o una porción de estos (por ejemplo, una metionina está ligada al N-terminal de una cadena A y/o una cadena B de relaxina, que resulta de la expresión recombinante, por ejemplo, en *E. coli*), fusiones con fines de purificación (que incluyen, entre otros, a polihistidina o a epítopos de afinidad), fusiones con péptidos de fijación a albúmina de suero, tales como adnectina PKE y fusiones con proteínas séricas, tales como albúmina de suero, y proteínas de fusión que comprenden relaxina y una o más moléculas diferentes ("componente de

fusión"), que incluyen, entre otros, albúmina de suero, dominio Fc, región constante de inmunoglobulina, polipéptido no estructurado, adnectina, y un fragmento de estos. Cualquiera de esos fragmentos se puede preparar de las proteínas mediante métodos bioquímicos estándares, o mediante la expresión de un polinucleótido que codifica el fragmento.

A menos que se indique lo contrario, en general, como se usan en la presente, las expresiones "polipéptido de relaxina" y "relaxina" abarcan tanto polipéptidos de relaxina no modificada (es decir, de tipo silvestre) como polipéptidos de relaxina modificada.

La expresión "polipéptido de relaxina modificada" incluye polipéptidos conjugados con un polímero, tal como PEG o un prolongador PK, y puede comprender opcionalmente una o más derivatizaciones de cisteína, lisina u otros residuos. En algunas modalidades, el polipéptido de relaxina modificada puede comprender un ligador, un polímero o un prolongador PK, en donde el aminoácido al cual se conjuga el ligador, el polímero o el prolongador PK puede ser un aminoácido no natural de conformidad con la presente descripción, o un aminoácido codificado de manera natural (por ejemplo, lisina o cisteína) utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica, tales como acoplamiento a lisina o cisteína.

La expresión "polipéptido de relaxina modificada" también incluye polipéptidos de relaxina conjugados o ligados

al prolongador PK descrito en la presente mediante un aminoácido codificado de manera natural, por ejemplo, cisteína o lisina, en el polipéptido de relaxina. En algunas modalidades, el aminoácido codificado de manera natural puede ser una sustitución o inserción en el polipéptido de relaxina.

La expresión "polipéptido de relaxina modificada" también incluye relaxina modificada glucosilada, tal como polipéptidos glucosilados en cualquier posición de aminoácido, formas glucosiladas ligadas a N o ligadas a O del polipéptido. Asimismo, se incluyen las variantes de empalme.

Todas las referencias a las posiciones de aminoácidos en la relaxina modificada o no modificada que se describen en la presente se basan en la posición correspondiente en la cadena A de SEQ ID NO: 4 o la cadena B de SEQ ID NO:5, a menos que se especifique lo contrario. Las personas de experiencia en la técnica comprenderán que las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones en SEQ ID NO: 4 o 5, u otra secuencia de relaxina se pueden identificar fácilmente en cualquier otra molécula de relaxina, tal como fusiones, variantes, fragmentos, etc. de relaxina. Por ejemplo, se pueden usar programas de alineación de secuencias, tales como BLAST, para alinear e identificar una posición particular en una proteína que corresponde a una posición en SEQ ID NO: 4 o 5, u otra secuencia de relaxina.

Las sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos descritas en la presente en referencia a SEQ ID NO: 4 o 5, u otra secuencia de relaxina también se refieren a sustituciones, supresiones o adiciones en las posiciones correspondientes en fusiones, variantes, fragmentos, etc. de relaxina que se describen en la presente o que se conocen en el estado de la técnica y quedan abarcadas expresamente por la presente descripcióNo.

La expresión "polipéptido de relaxina modificada" también abarca homodímeros, heterodímeros, homomultímeros y heteromultímeros que se forman mediante componentes de fusión, tales como dominios Fc, o que están ligados, entre otros, a aquellos ligados directamente a través de cadenas laterales del aminoácido codificado de manera no natural, ya sea a las mismas cadenas laterales del aminoácido codificado de manera no natural o a cadenas laterales diferentes de este, a cadenas laterales del aminoácido codificado de manera natural, o indirectamente a través de un ligador. Los ejemplos de ligadores incluyen, entre otros, compuestos orgánicos pequeños, polímeros soluble en aguas de varias longitudes, tales como poli(etilenglicol) o polidextrano, o péptidos o polipéptidos, por ejemplo, de hasta 50. 40. 30. 25, 20. 15, 10. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o hasta 1 aminoácidos de longitud.

Como se usa en la presente, el término "modificado"

se refiere a cualquier cambio hecho a un polipéptido determinado, tal como cambios en la longitud del polipéptido, la secuencia de aminoácidos, la estructura química, la modificación simultánea a la traducción, o la modificación después de la traducción de un polipéptido. La expresión "modificada después de la traducción" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o aminoácido no natural que se produce en ese aminoácido después de ser incorporado en una cadena de polipéptidos. El término abarca, únicamente a modo de ejemplo, modificaciones *in vivo* simultáneas a la traducción, modificaciones *in vitro* simultáneas a la traducción (como ocurre en un sistema de traducción libre de células), modificaciones *in vivo* después de la traducción y modificaciones *in vitro* después de la traducciónNo.

Un "aminoácido codificado de manera no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes, pirrolisina ni selenocisteína. Otra expresión que se puede usar como sinónimo de "aminoácido codificado de manera no natural" es "aminoácido no natural". La expresión "aminoácido codificado de manera no natural" también incluye, entre otros, aminoácidos que se producen por modificación (por ejemplo, modificaciones después de la traducción) de un aminoácido codificado de manera natural (que incluye, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína), pero que no se incorporan naturalmente en

una cadena de polipéptidos de crecimiento por medio de un complejo de traducciónNo. Los ejemplos de tales aminoácidos codificados de manera no natural incluyen, entre otros, *N*-acetilglucosaminil-L-serina, *N*-acetilglucosaminil-L-treonina y O-fosfotirosina.

En el contexto de un polipéptido de relaxina modificada, como se usan en la presente, los términos "para-acetil-fenilalanina" y "para-acetil-L-fenilalanina" (que incluyen las abreviaturas pAcF y pAF) también abarcan los productos de reacciones químicas en donde el grupo acetilo en la posición para está ausente y, en su lugar, un enlace a otra molécula está presente. Por ende, por ejemplo, en un polipéptido de relaxina modificada que comprende una para-acetil-fenilalanina (tal como para-acetil-L-fenilalanina), la para-acetil-fenilalanina puede comprender una oxima, un triazol, una amida u otro enlace en la posición para, por ejemplo, que tenga un enlace oxima que surja como resultado de la reacción del grupo carbonilo de para-acetil-L-fenilalanina con un grupo aminooxi, y que carezca de un carbono carbonilo, en la posición para. Tal para-acetil-fenilalanina se puede denominar "para-acetil-fenilalanina modificada", por ejemplo, "para-acetil-L-fenilalanina modificada".

Un ejemplo de aminoácido codificado de manera no natural es para-acetil fenilalanina (pACF). Se puede

sintetizar usando el procedimiento descrito anteriormente en Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., Biochemistry, (2003) 42, 6735-6746, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Un "grupo de modificación del amino-terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al amino-terminal de un polipéptido. De manera similar, un "grupo de modificación del carboxi-terminal" se refiere a cualquier molécula que se puede unir al carboxi-terminal de un polipéptido. Los grupos de modificación del terminal incluyen, entre otros, distintos polímeros solubles en aguas, metionina, péptidos o proteínas, tales como albúmina de suero, dominio Fc, región constante de inmunoglobulina, polipéptido no estructurado, adnectina o un fragmento de estos, ácidos grasos o derivados de estos, u otras porciones que aumentan la semivida en suero (*in vivo*) de polipéptidos.

Las expresiones "grupo funcional", "porción activa", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "porción químicamente reactiva" se usan en el estado de la técnica y en la presente para diversas porciones o unidades definibles de una molécula. Los términos son de algún modo sinónimos en el campo de la química y se usan en la presente para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y que son reactivas con otras moléculas.

En la presente, el término “enlace” se usa para referirse a grupos o enlaces que normalmente se forman como resultado de una reacción química y, en general, son enlaces covalentes. “Enlaces hidrolíticamente estables” significa que los enlaces son sustancialmente estables en agua y no reaccionan con agua a valores de pH útiles, lo que incluye, entre otros, en condiciones fisiológicas durante un período prolongado, tal vez indefinidamente. “Enlaces hidrolíticamente inestables o degradables” significa que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, lo que incluye, por ejemplo, sangre. “Enlaces enzimáticamente inestables o degradables” significa que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Como se comprende en el estado de la técnica, PEG, ácidos grasos y otros polímeros pueden incluir enlaces degradables en la estructura principal del polímero o en el grupo ligador entre la estructura principal del polímero y uno o más de los grupos funcionales del terminal de la molécula polimérica. Por ejemplo, los enlaces de éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos o ácidos carboxílicos activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo generalmente se hidrolizan en condiciones fisiológicas para liberar el agente. Otros enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, entre otros, enlaces de carbonato; enlaces de imina que pueden resultar de la reacción de una amina y un aldehído;

enlaces de ésteres de fosfato que se pueden formar mediante la reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces de hidrazona, que pueden ser el producto de la reacción de hidrazida y un aldehído; enlaces de acetal, que pueden ser el producto de la reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces de ortoésteres, que pueden ser el producto de la reacción de un formiato y un alcohol; enlaces de péptidos que pueden estar formados por un grupo amina, por ejemplo, entre otros, en un extremo de un polímero, y un grupo carboxilo de un péptido; oxima, o enlaces de semicarbazona que pueden ser el producto de reacción de una funcionalidad carbonilo y un reactivo que contiene hidroxilamina o semicarbazida; y enlaces de oligonucleótidos que pueden estar formados por un grupo fosforamidita, por ejemplo, entre otros, en el extremo de un polímero, y un grupo hidroxilo 5′ de un oligonucleótido.

Cuando los grupos sustituyentes se especifican mediante sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan de igual modo los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, la estructura CH2O es equivalente a la estructura -OCH2. Las composiciones que se describen en la presente pueden incluir compuestos etiquetados de manera isotópica con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un

número másico diferentes de la masa atómica o el número másico hallados generalmente en la naturaleza. Las composiciones presentadas en la presente pueden incluir isómeros, que incluyen, entre otros, diastereómeros, enantiómeros y mezclas de estos, por ejemplo, L-aminoácidos y/o D-aminoácidos (tales como para-acetil-D-fenilalanina y/o para-acetil-L-fenilalanina).

El término "sustituyentes" incluye, entre otros, "sustituyentes que no interfieren". Los "sustituyentes que no interfieren" son aquellos grupos que producen compuestos estables. Los radicales o sustituyentes adecuados que no interfieren incluyen, entre otros, halo, alquilo C_1-C_{10}. alquenilo C_2-C_{10}. alquinilo C_2-C_{10}. alcoxi C_1-C_{10}. aralquilo C_1-C_{12}, alcarilo C_1-C_{12}, cicloalquilo C_3-C_{12}, cicloalquenilo C_3-C_{12}, fenilo, fenilo sustituido, toluoílo, xilenilo, bifenilo, alcoxialquilo C_2-C_{12}, alcoxiarilo C_2-C_{12}, ariloxialquilo C_7-C_{12}, oxiarilo C_7-C_{12}, alquilsulfinilo C_1-C_6, alquilsulfonilo C_1-C_{10}. --(CH2)m --O--(alquilo C_1-C_{10}), en donde m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, --NO2, --CN, --NRC(O)--(alquilo C_1-C_{10}), --C(O)--(alquilo C_1-C_{10}), alquilo C_2-C_{10}-tioalquilo, --C(O)O--(alquilo C_1-C_{10}), --OH, --SO_2, =S, --COOH, --NR_2, carbonilo, --C(O)--(alquilo C_1-C_{10})-CF3, --C(O)—CF3, --C(O)NR2, --(arilo C_1-C_{10})-S--(arilo C_6-C_{10}), --C(O)--(arilo C_1-C_{10}), --(CH2)m --O--(--

(CH2)m--O--(alquilo C_1-C_{10}), en donde cada m es de 1 a 8, --C(O)NR2, --C(S)NR2, -- SO2NR2, --NRC(O) NR2, --NRC(S) NR2, sales de estos, y similares. Como se usa en la presente, cada R es H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, aralquilo o alcarilo.

El término "halógeno" incluye fluoro, cloro, yodo y bromo.

A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa una cadena lineal o ramificada, o un radical hidrocarburo cíclico, o una combinación de estos, que puede ser totalmente saturados, mono o poliinsaturados y pueden incluir radicales divalentes y multivalentes, que tienen la cantidad de átomos de carbono designada (es decir, C1-C10 significa 1 a 10 carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarburo saturados incluyen, entre otros, grupos, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es aquel que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, entre otros, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-

propinilo, 3-butinilo, y homólogos e isómeros más altos. A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" también incluye los derivados de alquilo definidos a continuación en mayor detalle, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

El término "alquileno" en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, entre otros, mediante las estructuras –CH2CH2– y –CH2CH2CH2CH2–, y también incluye los grupos descritos a continuación como "heteroalquileno". Generalmente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, en donde esos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono son una modalidad particular de los métodos y las composiciones que se describen en la presente. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta que tiene, en general, 8 o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

A menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquilo", en sí mismo o en combinación con otro

término, significa una cadena lineal o ramificada estable, o un radical hidrocarburo cíclico, o combinaciones de estos, que consisten en la cantidad indicada de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno se puede cuaternizar opcionalmente. Los heteroátomos O, N, S y Si pueden estar ubicados en cualquier posición interna del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, entre otros, -CH2-CH2-O-CH3, -CH2-CH2-NH-CH3, -CH2-CH2-N(CH3)-CH3, -CH2-S-CH2-CH3, -CH2-CH2,-S(O)-CH3, -CH2-CH2-S(O)2-CH3, -CH=CH-O-CH3, -Si(CH3)3, -CH2-CH=N-OCH3 y –CH=CH-N(CH3)-CH3. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como -CH2-NH-OCH3 y –CH2-O-Si(CH3)3. De manera similar, el término “heteroalquileno”, en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, entre otros, mediante -CH2-CH2-S-CH2 CH2- y –CH2-S-CH2-CH2-NH-CH2-. Para los grupos heteroalquileno, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno de los terminales de la cadena o ambos (que incluyen, entre otros, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino, aminooxialquileno y similares). Asimismo, en el caso de los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, no se puede

inferir la orientación del grupo de enlace a partir de la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace. Por ejemplo, la fórmula –C(O)2R’ representa –C(O)2R’ y –R’C(O)2.

A menos que se indique lo contrario, los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, en sí mismos o en combinación con otros términos, representan versiones cíclicas de “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluye enlaces de anillos saturados, parcialmente insaturados y totalmente insaturados. De manera adicional, en el caso de heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, entre otros, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, entre otros, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrothien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares. De manera adicional, el término abarca las estructuras de anillos bicíclicos y tricíclicos. De manera similar, el término “heterocicloalquileno”, en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término

"cicloalquileno". en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

A menos que se indique lo contrario, el término "arilo" significa un sustituyente hidrocarburo poliinsaturado, aromático que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (lo que incluye, entre otros, de 1 a 3 anillos) que se fusionan o se ligan de manera covalente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente, y los átomos de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-thienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes de cada uno de los sistemas de anillos de

arilo y heteroarilo antes mencionados se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuaciónNo.

Para mayor brevedad, el término "arilo", cuando se usa en combinación con otros términos (que incluyen, entre otros, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye los anillos de arilo y heteroarilo definidos anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" incluye los radicales en donde un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (que incluye, entre otros, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), que incluye los grupos alquilo en donde un átomo de carbono (que incluye, entre otros, un grupo metileno) se reemplazó, por ejemplo, con un átomo de oxígeno (que incluye, entre otros, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Cada uno de los términos anteriores (que incluyen, entre otros, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluyen formas sustituidas o no sustituidas del radical indicado. A continuación se indican los ejemplos de sustituyentes para cada tipo de radical.

Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (que incluyen los grupos que suelen denominarse alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) pueden ser uno o más de varios grupos

seleccionados, entre otros, de: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', -CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR' C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", NR C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN y –NO2 en una cantidad que varía de 0 a (2m'+1), en donde m' es la cantidad total de átomos de carbono en ese radical. Cada uno de R', R", R"' y R"" se refiere independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, que incluye, entre otros. arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada grupo R', R", R'" y R"", cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R" debe incluir, entre otros, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del análisis anterior sobre sustituyentes, una persona experta en la técnica comprenderá que el término "alquilo" debe incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a otros grupos en lugar de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (que incluye, entre otros, -CF3 y –CH2CF3) y acilo (que incluye, entre otros, -C(O)CH3, -C(O)CF3, -

C(O)CH2OCH3 y similares).

De manera similar a lo que ocurre con los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes de los grupos arilo y heteroarilo son variados y se seleccionan, por ejemplo, de: halógeno, OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', OC(O)R', -C(O)R', CO2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', NR'C(O)NR"R"', -NR"C(O)2R', NR-C(NR'R"R'")=NR"", NR C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -S(O)2R', -S(O)2NR'R", NRSO2R', -CN y -NO2, -R', -N3, -CH(Ph)2, fluoro(C1-C4)alcoxi y fluoro(C1-C4)alquilo, en una cantidad que varía de 0 a la cantidad total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos; y en donde R', R", R"' y R"" se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada grupo R', R", R'" y R"", cuando más de uno de estos grupos está presente.

La expresión "ácido graso" se refiere a una cadena de acilo saturado o insaturado que tiene de 6 a 20 átomos de carbono o un derivado de estos. En algunas modalidades, el ácido graso puede estar ligado a un componente peptídico del mejorador de PK descrito en la presente y terminar en un ácido carboxílico o un grupo metilo. En algunas modalidades,

el ácido graso ligado al componente peptídico del mejorador PK puede terminar en un ácido carboxílico. En algunas modalidades, el ácido graso puede estar ligado al componente peptídico mediante un enlace de amida. En algunas modalidades, el ácido graso puede tener de 10 a 18 átomos de carbono. En algunas modalidades, el ácido graso puede tener de 12 a 17 átomos de carbono. En algunas modalidades, el ácido graso puede tener 14, 15 o 16 átomos de carbono. En algunas modalidades, el ácido graso puede tener 15 átomos de carbono.

Como se usa en la presente, la expresión "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que es soluble en solventes acuosos. El enlace de polímeros soluble en aguas con polipéptidos de relaxina modificada puede dar como resultado cambios que incluyen, entre otros, mayor semivida en suero (*in vivo*) o semivida en suero (*in vivo*) modulada, o mayor semivida terapéutica o semivida terapéutica modulada, con respecto a la forma no modificada, toxicidad o inmunogenicidad reducida o modulada, características de asociación física modulada, tales como menor agregación y formación de multímeros, fijación al receptor alterada, fijación alterada a uno o más componentes de fijación, y dimerización o multimerización del receptor alterada. El polímero soluble en agua puede o no tener su propia actividad biológica, y se puede usar como un ligador para unir la

relaxina modificada a otras sustancias, que incluyen, entre otros, uno o más polipéptidos de relaxina modificada o no modificada, o una o más moléculas biológicamente activas. Los polímeros adecuados incluyen, entre otros, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, mono alcoxi C1-C10 o derivados de ariloxi de estos (descritos en la patente estadounidense No.° 5.252.714 que se incorpora en la presente por referencia), monometoxi-polietilenglicol, PEG discreto, polivinilpirrolidona, polivinilalcohol, poliaminoácidos, anhídrido maleico diviniléter, *N*-(2-hidroxipropil)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, poliol polioxietilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glucanos, celulosa y derivados de celulosa, que incluyen, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y derivados de almidón, polipéptidos de dos o más aminoácidos, polialquilenglicol y derivados de estos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de estos, poliviniletiléteres y alfa-beta-poli[(2-hidroxietil)-DL-aspartamida, y similares, o mezclas de estos. Los ejemplos de tales polímeros soluble en aguas incluyen, entre otros, polietilenglicol y albúmina de suero.

Como se usa en la presente, el término "polialquilenglicol" (PEG) o "poli(alquenglicol)" se refiere

a polietilenglicol (poli(etilenglicol)), polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de estos. El término "polialquilenglicol" abarca polímeros lineales y ramificados, y pesos moleculares promedio de 0.1 kDa a 100 kDa. Se enumeran otras modalidades de ejemplo, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, tales como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001).

Como se usan en la presente, las expresiones "semivida en suero modulada" o "semivida *in vivo* modulada" y expresiones similares se refieren al cambio positivo o negativo en la semivida en circulación de una relaxina modificada con respecto a un comparador, tal como su forma no modificada, o la relaxina de tipo silvestre. La semivida en suero se puede medir tomando muestras de sangre en distintos puntos temporales después de la administración de una relaxina modificada, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración sérica con el tiempo permite calcular la semivida en suero. Una mayor semivida en suero (*in vivo*) puede tener, convenientemente, un aumento de al menos alrededor del doble, pero puede resultar útil un aumento menor, por ejemplo, en donde este permite un régimen de dosis satisfactorio o evita un efecto tóxico. En algunas modalidades, el aumento puede ser de al menos alrededor de 3 veces, al menos alrededor de 5

veces, al menos alrededor de 10 veces, al menos alrededor de 20 veces o al menos alrededor de 50 veces.

Como se usa en la presente, la expresión "semivida terapéutica modulada" significa el cambio positivo o negativo en la semivida en suero o *in vivo* de la cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente, con respecto a un comparador, tal como su forma no modificada o la relaxina de tipo silvestre. La semivida terapéutica se calcula midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en distintos puntos temporales después de la administracióNo. El aumento de la semivida terapéutica permite convenientemente un régimen de dosis particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. En algunas modalidades, el aumento de la semivida terapéutica resulta de una mayor potencia, mayor o menor fijación de la molécula modificada a su objetivo, mayor o menor descomposición de la molécula por parte de enzimas, tales como proteasas, o un aumento o una disminución en otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada o un aumento o una disminución de la depuración mediada por el receptor de la molécula. En algunas modalidades, el aumento en la semivida terapéutica puede ser de al menos alrededor de 2 veces, al menos alrededor de 3 veces, al menos alrededor de 5 veces, al menos alrededor de 10 veces, al

menos alrededor de 20 veces o al menos alrededor de 50 veces.

Cuando se aplica a un ácido nucleico o a una proteína, el término "aislado" indica que el ácido nucleico o la proteína es libre de al menos algunos de los componentes celulares con que se asocia en el estado natural o que el ácido nucleico o la proteína se concentraron a un nivel mayor que la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*. Puede ser en un estado homogéneo. Las sustancias aisladas pueden estar en un estado seco o semiseco, o en solución, lo que incluye, entre otros, una solución acuosa. Puede ser un componente de una composición farmacéutica que comprende portadores y/o excipientes aceptables farmacéuticamente aceptable adicionales. Generalmente, la pureza y la homogeneidad se determinan usando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alta resolucióNo. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación se purifica sustancialmente. En particular, un gen aislado se separa de marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína que no es el gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o una proteína genera, sustancialmente, una banda en el gel electroforético. En particular, puede significar que el ácido nucleico o la proteína son al menos 85 % puros, al menos 90 % puros, al menos 95 % puros, al menos 99 % puros, o más.

La expresión “ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de estos, ya sean monocatenarios o bicatenarios. A menos que se indique lo contrario, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de fijación similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique una limitación, el término también se refiere a análogos de oligonucleótidos que incluyen PNA (ácido peptidonucleico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares). A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca, implícitamente, variantes de esta modificadas de manera conservadora (lo que incluye, entre otros, sustituciones del codón degenerado) y secuencias complementarias, además de la secuencia indicada de manera explícita.

En la presente, los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Esto quiere decir que una descripción dirigida a un polipéptido se aplica de igual manera a la descripción de un péptido y a la descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se

aplican a polímeros de aminoácidos naturales, así como a polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos son un aminoácido codificado de manera no natural. Como se usa en la presente, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, lo que incluye proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos se ligan mediante enlaces de péptidos covalentes.

Las "variantes modificadas de manera conservadora" se refieren a secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones conservadoras. Algunos ejemplos de variantes modificadas de manera conservadora incluyen sustituciones, supresiones o inserciones a una secuencia de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos o proteínas que alteran, agregan o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos o secuencia de polipéptidos codificados, por ejemplo, hasta 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o hasta 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 % o 3.5 % de los aminoácidos en la secuencia de polipéptidos o secuencia de polipéptidos codificados, que opcionalmente puede ser o puede incluir la sustitución de aminoácidos con aminoácidos químicamente similares. Las personas de experiencia en la técnica conocen las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar. Esas variantes modificadas de manera conservadora son adicionales y no excluyentes de las variantes polimorfas,

los homólogos interespecies y los alelos de los polipéptidos de relaxina modificada descritos.

Las personas de experiencia en la técnica conocen las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos de funcionalidad similar. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Alanina (A o Ala), glicina (G o Gly);

2) Ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu);

3) Asparagina (N o Asn), glutamina (Q o Gln);

4) Arginina (R o Arg), lisina (K o Lys), histidina (H o His);

5) Isoleucina (I o Ile), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), valina (V o Val);

6) Fenilalanina (F o Phe), tirosina (Y o Tyr), triptófano (W o Trp);

7) Serina (S o Ser), treonina (T o Thr); y

8) Cisteína (C o Cys), metionina (M o Met)

(Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2.ª edición (diciembre de 1993)

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más

secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son “sustancialmente idénticas” si tienen un porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % de identidad en una región específica), cuando se compararan y se alinean para lograr una correspondencia máxima en una ventana de comparación o en una región designada medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias (u otros algoritmos disponibles para las personas de experiencia en la técnica) o mediante la alineación manual y la inspección visual. La identidad puede existir en una región o ventana de comparación que tiene una longitud de al menos alrededor de 20 aminoácidos o nucleótidos, o en una región que tiene una longitud de al menos alrededor de 25 aminoácidos o nucleótidos o, cuando no se especifica, en la totalidad de la secuencia de un polinucleótido o polipéptido. Como se usa en la presente, una “ventana de comparación” incluye la referencia a cualquier segmento de posiciones contiguas, por ejemplo, al menos alrededor de 10. 15, 20. 25 o 30 aminoácidos, en donde una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente dos

secuencias. Algunos ejemplos de algoritmos que pueden ser adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0. que se describen en Altschul *et al.* (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol*. 215:403-410. respectivamente, al igual que los algoritmos Smith-Waterman (Smith and Waterman, J Mol Biol. 25 de marzo de 1981;147(1):195-7) o Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, J Mol Biol., 1970 Mar;48(3):443-53), que se pueden ejecutar con los parámetros por defecto, por ejemplo, como se describen en las respectivas publicaciones.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal, en algunas modalidades, a un mamífero, y en otras modalidades, a un ser humano, que es el objeto del tratamiento, la observación o el experimento. Un animal puede ser un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), un animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de Indias y similares).

Como se usa en la presente, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto (por ejemplo, un polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente) que se administra, que puede prevenir, curar, aliviar, retrasar la aparición, disminuir la gravedad o reducir, en cierta medida, uno o más de los síntomas de la

enfermedad, afección o trastorno que se esté tratando. Las composiciones que contienen el polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se pueden administrar para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos.

Los términos "mejorar" o "mejorador" significan aumentar o prolongar, ya sea en potencia o en duración, un efecto deseado. Por lo tanto, en relación con la mejora del efecto de los agentes terapéuticos, el término "mejorar" se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o en duración, el efecto de otros agentes terapéuticos en un sistema.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el polipéptido de relaxina modificada se administran a un paciente susceptible o en riesgo de contraer una enfermedad, un trastorno o una afección particulares. Esa cantidad se define como una "cantidad profilácticamente efectiva".

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones que comprenden el polipéptido de aminoácido no natural modificado se administran a un paciente que ya tiene una enfermedad, afección o trastorno, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente o aliviar los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección. Esa cantidad se define como una "cantidad terapéuticamente efectiva" y puede depender de la gravedad

y el curso de la enfermedad, el trastorno o la afección, un tratamiento anterior, el estado de salud del paciente y la respuesta a los fármacos, además del criterio del médico. Se considera que una persona experta en la técnica sabrá determinar esas cantidades terapéuticamente eficaces mediante la experimentación de rutina (por ejemplo, un ensayo clínico de incremento de dosis).

El término "tratar" se usa para referirse a tratamientos profilácticos y/o tratamientos terapéuticos.

Como se usa en la presente, "agente reductor", con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que mantiene grupos sulfhidrilo en el estado reducido y que reduce puentes disulfuro intramoleculares o intermoleculares. Los agentes reductores adecuados incluyen, entre otros, ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol, cisteína, cisteamina (2-aminoetantiol) y menos glutatióNo. Resulta evidente para las personas de experiencia en la técnica que una amplia variedad de agentes reductores son adecuados para usar en los métodos y las composiciones de la presente invenciónNo.

Como se usa en la presente, "agente de oxidación", con respecto al replegamiento de proteínas, se define como cualquier compuesto o material que puede eliminar un electrón de un compuesto que se oxida. Los agentes de oxidación adecuados incluyen, entre otros,

glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitol oxidado, eritreitol oxidado y oxígeno. Resulta evidente para las personas de experiencia en la técnica que una amplia variedad de agentes de oxidación son adecuados para usar en los métodos de la presente invenciónNo.

Como se usan en la presente, "agente desnaturalizante" o "desnaturalizante" se definen como cualquier compuesto o material que causará el desplegamiento reversible de una proteína. La concentración de un agente desnaturalizante o de un desnaturalizante se determinará mediante las propiedades y la concentración del agente desnaturalizante o el desnaturalizante particular. Los agentes desnaturalizantes o los desnaturalizantes adecuados pueden ser caotrópicos, detergentes, solventes orgánicos, solventes miscibles en agua, fosfolípidos, o una combinación de dos o más agentes. Los caotrópicos adecuados incluyen, entre otros, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los detergentes útiles pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes, tales como dodecilsulfato de sodio, o éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Triton), sarcosilo, detergentes suaves no iónicos (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves, tales como N-›2,3-(dioleioxi)-propil-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato de sodio o

desoxicolato de sodio) o detergentes zwitteriónicos, que incluyen, entre otros, sulfobetaínas (Zwittergent), 3-(3-clolamidopropil)dimetilamonio-1-propansulfato (CHAPS) y 3-(3-clolamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propansulfonato (CHAPSO). Se pueden usar solventes orgánicos miscibles en agua, tales como acetonitrilo, alcanoles inferiores (en especial, C2 - C4 alcanoles, tales como etanol o isopropanol), o alcandioles inferiores (en especial, C2 - C4 alcandioles, tales como etilenglicol) como desnaturalizantes. Los fosfolípidos útiles en la presente invención pueden ser fosfolípidos naturales, tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, o derivados o variantes fosfolipídicos sintéticos, tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

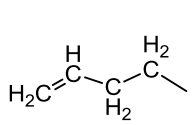
Como se usa en la presente, "replegamiento" describe cualquier proceso, reacción o método que transforma el puente disulfuro que contiene polipéptidos de un estado desplegado o incorrectamente plegado a una conformación nativa o correctamente plegada con respecto a los puentes disulfuro.

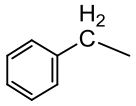
Como se usa en la presente, el "coplegamiento" se refiere específicamente a procesos, reacciones o métodos de replegamiento que utilizan al menos dos polipéptidos

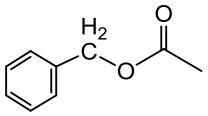
que interactúan entre sí y que dan como resultado la transformación de polipéptidos desplegados o incorrectamente plegados a polipéptidos nativos, correctamente plegados.

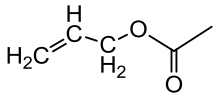
El término "protegido" se refiere a la presencia de un "grupo protector" o porción que previene la reacción del grupo funcional químicamente reactivo en determinadas condiciones de reacciónNo. El grupo protector variará en función del tipo de grupo químicamente reactivo que se desea proteger. Por ejemplo, si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se puede seleccionar del grupo de terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopiridildisulfuro. Si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, tal como ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser un grupo bencilo o alquilo, tal como metilo, etilo o terc-butilo. Otros grupos protectores conocidos en el estado de la técnica también se pueden usar en métodos y composiciones descritos en la presente, o con estos, lo que incluye grupos fotolábiles, tales como Nvoc y MeNvoc. Otros grupos protectores conocidos en el estado de la técnica también se pueden usar en los métodos y las composiciones descritos en la presente, o con estos.

A modo de ejemplo únicamente, los grupos protectores/bloqueadores se pueden seleccionar de:

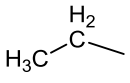

alilo

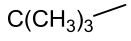

Bn

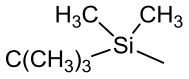

Cbz

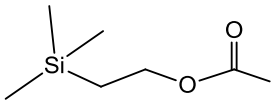

alloc

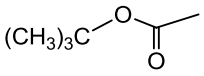

Me

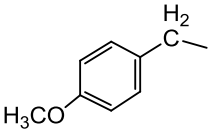

Et

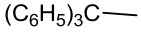

t-butilo

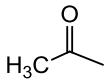

TBDMS

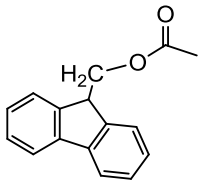

Teoc


Boc


pMBn


tritilo


acetilo


Fmoc

Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3.ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Las expresiones "trastornos del sistema cardiovascular" o "trastornos cardiovasculares" incluyen, por ejemplo, los siguientes trastornos: hipertensión (presión sanguínea alta), trastornos vasculares periféricos y cardíacos, cardiopatía coronaria, angina de pecho estable e inestable, infarto de miocardio, insuficiencia miocárdica, frecuencias cardíacas anormales (o arritmias), disfunción isquémica persistente ("miocardio hibernado"), disfunción

posisquémica temporal (“miocardio aturdido”), insuficiencia cardíaca, alteraciones del flujo de sangre periférica, síndrome coronario agudo, enfermedad del músculo cardíaco (miocardiopatía) y enfermedad vascular (enfermedad de los vasos sanguíneos).

La expresión “insuficiencia cardíaca” incluye manifestaciones tanto agudas como crónicas de insuficiencia cardíaca, al igual que tipos de enfermedades más específicos o relacionados, tales como insuficiencia cardíaca avanzada, insuficiencia cardíaca posaguda, síndrome cardiorrenal, insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada a defectos cardíacos congénitos, defectos de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca asociada a defectos de la válvula cardíaca, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricuspídea, insuficiencia tricuspídea, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada a defectos conjuntos de la válvula cardíaca, inflamación miocárdica (miocarditis), miocarditis crónica,

miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada a trastornos del almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, fases agudas de insuficiencia cardíaca progresiva, insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión conservada (HFrEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión reducida (HFrEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión conservada (HFpEF), reestructuración posterior al infarto de miocardio, angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar.

La expresión “trastornos fibróticos” abarca enfermedades y trastornos caracterizados por la fibrosis, que incluyen, entre otros, las enfermedades y los trastornos siguientes: fibrosis hepática, cirrosis hepática, NASH, fibrosis pulmonar, fibrosis cardíaca, fibrosis endomiocárdica, nefropatía, glomerulonefritis, fibrosis renal intersticial, daño fibrótico como resultado de la diabetes, fibrosis de médula ósea y trastornos fibróticos similares, escleroderma, morfea, queloides, cicatrización hipertrófica (también luego de procedimientos quirúrgicos), nevos, retinopatía diabética, vitreorretinopatía proliferativa y trastornos del tejido conector (por ejemplo, sarcoidosis).

Las expresiones “trastorno asociado a relaxina” y

"enfermedad asociada a relaxina" abarcan enfermedades y trastornos que se pueden prevenir, tratar, aliviar o afectar de otro modo mediante modulación del nivel de relaxina en el cuerpo, tal como mediante el aumento del nivel de proteína relaxina en suero. Los trastornos asociados a relaxina incluyen, entre otros, los trastornos del sistema cardiovascular y los trastornos fibróticos descritos en la presente.

Los polipéptidos que comprenden aminoácidos codificados de manera no natural que se describen en la presente pueden incluir compuestos etiquetados de manera isotópica con uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferentes de la masa atómica o el número másico hallados generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la presente incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{17}O, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl, respectivamente. Determinados compuestos etiquetados isotópicamente descritos en la presente, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como ^{3}H y ^{14}C, pueden ser útiles en ensayos de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Asimismo, la sustitución con isótopos, tales como deuterio, es decir, ^{2}H, puede producir algunas ventajas terapéuticas que surgen de una

mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menos requisitos de dosificaciónNo.

I. Descripción general

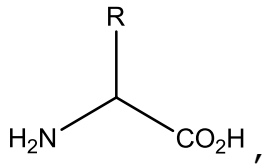
En la descripción, se proporcionan moléculas de relaxina modificada unidas a un mejorador PK. Se demostró que las modalidades de ejemplo presentan al menos una propiedad ventajosa seleccionada de mayor semivida *in vivo*, menor formación de vacuolos renales, mayor flujo sanguíneo renal, mayor solubilidad, menor agregación, menor viscosidad, mayor facilidad de elaboración, en comparación con otros polipéptidos de relaxina modificada o de tipo silvestre.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido de relaxina modificada que comprende un aminoácido codificado de manera no natural, en donde:

(a) el polipéptido de relaxina modificada comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituido con un aminoácido codificado de manera no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: residuo 1 de la cadena A, residuo 2 de la cadena A, residuo 5 de la cadena A, residuo 13 de la cadena A, residuo 18 de la cadena A, residuo 5 de la cadena B, residuo 7 de la cadena B y residuo 25 de la cadena B, y que tienen opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos adicionales en la cadena A de

relaxina y/o la cadena B de relaxina;

(b) el aminoácido codificado de manera no natural tiene la estructura:



en donde el grupo R es cualquier sustituyente diferente de la cadena lateral que se encuentra en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanin, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina;

(c) el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un mejorador farmacocinético que comprende un componente peptídico de 2 a 30 aminoácidos y una porción de prolongación de semivida.

En algunas modalidades, el polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 y que opcionalmente tiene hasta sustituciones, inserciones y/o supresiones adicionales de aminoácidos. El polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 y que opcionalmente tiene una sustitución, inserción o supresión adicional de aminoácidos. El

polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 que tienen opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones o supresiones adicionales de aminoácidos. El polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 que tienen opcionalmente una sustitución, inserción o supresión adicional de aminoácidos. El polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1, y tal polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el al menos un aminoácido codificado de manera no natural puede comprender un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. El aminoácido codificado de manera no natural puede comprender un derivado de fenilalanina. El aminoácido codificado de manera no natural se puede seleccionar de una fenilalanina parasustituida, ortosustituida o metasustituida. El aminoácido codificado de manera no natural se puede seleccionar de una fenilalanina parasustituida, ortosustituida o metasustituida que comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. El aminoácido codificado de manera no natural puede

comprender para-acetil-L-fenilalanina. El aminoácido codificado de manera no natural puede estar ligado al mejorador farmacocinético. Por ejemplo, el aminoácido codificado de manera no natural puede estar ligado al mejorador farmacocinético mediante un enlace oxima o enlace triazol, por ejemplo, un enlace oxima.

En algunas modalidades, el polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 35, y el polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, y en donde la cadena A o la cadena B de relaxina pueden tener opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones o supresiones adicionales de aminoácidos. El polipéptido de relaxina modificada puede comprender un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de cadena B de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. El polipéptido de la cadena A de relaxina puede tener al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35. El polipéptido de la cadena B de relaxina puede tener al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. El polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 35, y el polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el polipéptido de la cadena A de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 35, y el polipéptido de la cadena B de relaxina puede comprender SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el componente peptídico puede comprender de 1 a 25 aminoácidos, por ejemplo, de 2 a 20 aminoácidos, de 3 a 10 aminoácidos o de 4 a 8 aminoácidos. El componente peptídico puede comprender Glu, Glu^{Y}, GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 107), GETGSSGEGT-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 108), GGGKKK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 109), GSHHHHHGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 111), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 113), KKKSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 118), KKSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 114), KKSGGSGG-Glu^{α} (SEQ ID NO: 115), KKSAGSAG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 116), KSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 117), KKSGGSGGEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 119), dKdKdKdKdK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 120), EESGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 121), GSGSGSGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 123), EEEGGG-dGlu^{Y} (SEQ ID NO: 128), EGGGGSK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 130), EEEEEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 131), EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 133), EEEEPEEEEPEEEEPEEGGG (SEQ ID NO: 135), EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 136), KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 137), EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 138), KK-Glu^{Y}

(SEQ ID NO: 140), Glu^Y, KGPKGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 146), SGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 147), KGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 148), KGGGSE-Glu^Y (SEQ ID NO: 149), GSPGSP-Glu^Y (SEQ ID NO: 150), GGGGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 151), EGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 152), EGGGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 153), KGPGSE-Glu^Y (SEQ ID NO: 154), Espermina-Glu^Y o KKGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 156).

El componente peptídico puede comprender GGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu^Y (SEQ ID NO: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^Y (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 107), GGGKKK-Glu^Y (SEQ ID NO: 109), GSHHHHHGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^Y (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^Y (SEQ ID NO: 113) o KSGGSGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 117).

El componente peptídico puede comprender Glu^Y. Por ejemplo, el componente peptídico puede comprender GGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 139).

En modalidades ejemplares, el polipéptido de relaxina modificada puede comprender el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituidas con un aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 de la cadena A, en donde el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al mejorador farmacocinético, y tal mejorador farmacocinético comprende el

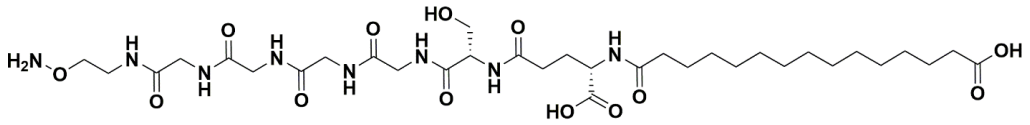
componente peptídico GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139). En algunas modalidades, el componente peptídico puede estar ligado de manera covalente al aminoácido codificado de manera no natural, por ejemplo, mediante un enlace oxima.

En modalidades ejemplares, la porción de prolongación de semivida puede comprender un ácido graso o un derivado de este, en donde el ácido graso, o el derivado de este, puede estar ligado de manera covalente al componente peptídico. La porción de prolongación de semivida puede comprender un ácido graso saturado o un derivado de este. La porción de prolongación de semivida puede comprender un ácido graso terminado con un ácido carboxílico. La porción de prolongación de semivida puede comprender un ácido graso de la Fórmula I: -Cn-COOH (Fórmula I), en donde n puede ser de 10 a 18, tal como de 12 a 17, o 13, 14, 15 o 16. En algunas modalidades, -Cn- de la Fórmula I puede comprender un primer carbono carbonilo y $-(CH_2)_{n-1}-$. Por ejemplo, -C13- puede ser $-(C=O)-(CH_2)_{12}-$; -C14- puede ser $-(C=O)-(CH_2)_{13}-$; -C15- puede ser $-(C=O)-(CH_2)_{14}-$. En algunas modalidades, el primer carbono carbonilo del ácido graso puede estar unido a un residuo Glu (gamma), opcionalmente mediante un enlace amida. En algunas modalidades, el primer carbono carbonilo del ácido graso puede estar unido a un residuo Glu gamma mediante un enlace amida.

En otras modalidades de ejemplo, la porción de

prolongación de semivida puede comprender -C14-COOH.

En otras modalidades de ejemplo, el mejorador farmacocinético puede comprender la estructura:



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

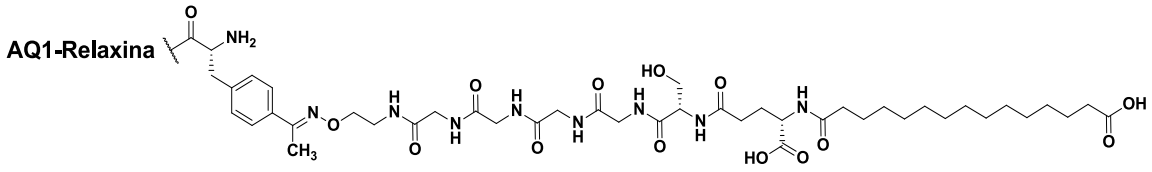
(Fórmula II)

en donde el grupo aminooxi de la Fórmula II está ligado al aminoácido no natural en el polipéptido de relaxina modificada, por ejemplo, mediante un enlace oxima.

En otras modalidades de ejemplo, la porción de prolongación de semivida puede estar conjugada con el componente peptídico mediante un enlace amida.

En otras modalidades de ejemplo, el polipéptido de relaxina puede comprender el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituidas con un aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 de la cadena A; en donde el aminoácido codificado de manera no natural comprende para-acetil-L-fenilalanina; en donde el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al mejorador farmacocinético que comprende un componente peptídico que comprende GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139); y una porción de prolongación de semivida que comprende -C14-COOH, tal como $-(C=O)-(CH_2)_{13}-COOH$.

En otra modalidad, la descripción proporciona un polipéptido de relaxina modificada que comprende la estructura:

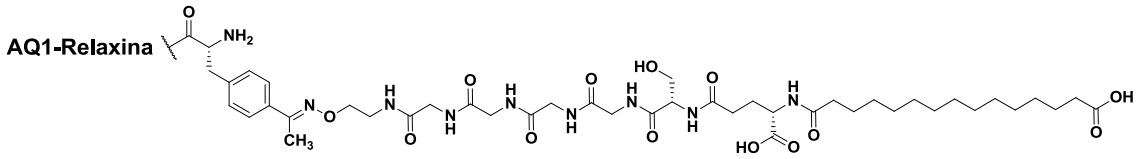


(Fórmula III),

en donde AQ1-relaxina comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de cadena B de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-L-fenilalanina que se ilustra en la Fórmula III está ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina. El polipéptido de la cadena A de relaxina puede tener al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35. El polipéptido de la cadena B de relaxina puede tener al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. La AQ1-relaxina puede comprender un polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

En otra modalidad, la descripción proporciona un polipéptido de relaxina modificada que comprende el conjugado de relaxina "AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$(SEQ ID NO: 139) -C14-COOH" que

comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-L-fenilalanina ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina puede estar ligada al mejorador PK GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, como se ilustra en la Fórmula III:



(Fórmula III).

En una modalidad adicional, el polipéptido de relaxina modificada comprende la estructura que se muestra en la Figura 8.

En una modalidad adicional, el polipéptido de relaxina modificada comprende la estructura que se muestra en la Figura 9.

En modalidades ejemplares, el polipéptido de relaxina modificada puede ser biológicamente activo. El polipéptido de relaxina modificada puede ser terapéuticamente efectiva para el tratamiento de una o más enfermedades o afecciones asociadas a la relaxina. El polipéptido de relaxina modificada puede presentar una menor formación de vacuolos renales, en comparación con un compuesto comparador, tal como AQ1-PEG de 20 kDa (relaxina AQ1 conjugada con PEG con un peso molecular promedio de 20 kDa). El polipéptido de

relaxina modificada puede presentar menor insuficiencia renal o no presentarla, en comparación con un compuesto comparador, tal como AQ1-PEG de 20 kDa. La función renal se puede medir determinando uno o más de los siguientes: tasa de filtración glomerular estimada, depuración de creatinina, tasa de filtración glomerular de insulina o tasa de filtración glomerular isotópica.

En modalidades ejemplares, el polipéptido de relaxina modificada no presenta menor flujo sanguíneo renal y/o puede ser capaz de aumentar el flujo sanguíneo renal después de la administraciónNo. El flujo de sangre renal se puede medir determinado la depuración de paraaminohipurato.

El polipéptido de relaxina modificada puede presentar una mayor semivida *in vivo*, por ejemplo, con al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces de aumento, en comparación con un compuesto comparador, tal como relaxina de tipo silvestre.

En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente y un portador aceptable farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente para el tratamiento o la prevención de un

trastorno asociado a relaxina y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada a la relaxina, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente. La enfermedad cardiovascular se puede seleccionar de arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, arritmia, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía y enfermedad vascular.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar, prevenir o aliviar un síntoma de insuficiencia cardíaca que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente. La insuficiencia cardíaca se puede seleccionar de insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome

cardiorrenal, insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada a defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada a defectos de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca asociada a defectos combinados de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada a trastornos del almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida (HFrEF), angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar.

En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca se puede seleccionar de insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión reducida (HFrEF), insuficiencia cardíaca crónica

con fracción de expulsión conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar.

En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca se puede seleccionar de insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome cardiorrenal e insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal.

Los métodos de tratamiento también pueden comprender administrar, en combinación, de manera concurrente o secuencial, con el polipéptido de relaxina modificada, al menos un agente terapéutico adicional seleccionado de inhibidores de ACE, bloqueadores β, diuréticos, antagonistas del receptor mineralocorticoide, moduladores del receptor de rianodina, activadores SERCA2a, inhibidores de renina, bloqueadores del canal de calcio, agonistas del receptor A1 de adenosina, receptor A1 de adenosina parcial, inhibidores de dopamina β-hidroxilasa, antagonistas del receptor de angiotensina II, antagonistas del receptor de angiotensina II con agonismo sesgado para seleccionar mediantes de transducción de señal celular, combinaciones de antagonistas del receptor de angiotensina II e inhibidores de la enzima neprilisina, inhibidores de la enzima neprilisina,

activadores de guanilato ciclasa soluble, activadores de miosina ATPasa, inhibidores de rho-quinasa 1, inhibidores de rho-quinasa 2, agonistas del receptor de apelina, compuestos donantes de nitroxilo, inhibidores de la quinasa II dependiente de calcio, agentes antifibróticos, inhibidores de galectina-3, antagonistas del receptor de vasopresina, moduladores del receptor de FPR2, agonistas del receptor de péptidos natriuréticos, bloqueadores del canal receptor de potencial transitorio vaniloide 4, agentes antiarrítmicos, bloqueadores del canal de la corriente "funny" I_f , nitratos, compuestos digitálicos, agentes inotrópicos y agonistas del receptor β, agentes reselladores de la membrana celular, por ejemplo, Poloxamer 188, agentes antihiperlipidémicos, agentes que aumentan HDL en plasma, agentes antihipercolesterolémicos, inhibidores del colesterol o la biosíntesis (tales como inhibidores de HMG CoA reductasa), agonista de LXR, agonista de FXR, probucol, raloxifeno, ácido nicotínico, niacinamida, inhibidores de la absorción del colesterol, secuestrantes del ácido biliar, resinas de intercambio aniónico, aminas cuaternarias, colestiramina, colestipol, inductores del receptor de lipoproteínas de baja densidad, clofibrato, fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrizol, vitamina B6, vitamina B12, vitaminas antioxidantes, agentes contra la diabetes, inhibidores de la agregación de plaquetas, antagonistas del receptor de

fibrinógeno, derivados de aspirina y ácido fíbrico, inhibidores de PCSK9, aspirina, e inhibidores de P2Y12, tales como Clopidogrel.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar, prevenir o aliviar un síntoma de una enfermedad asociada a la fibrosis, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente. La enfermedad asociada a la fibrosis puede comprender fibrosis del corazón, pulmón, riñón, médula ósea o hígado, fibrosis dermatológica o un síndrome de fibrosis ocular. La enfermedad asociada a la fibrosis se puede seleccionar de fibrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, precirrosis, enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis masiva progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis por inyección, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefropatía por IgA, mielofibrosis, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca metabólica, fibrosis cardíaca, fibrosis por cataratas, cataratas, cicatrización ocular, fibrosis pancreática, fibrosis dérmica, fibrosis intestinal, estenosis intestinal, fibrosis endomiocárdica,

fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, enfermedad de Crohn, fibrosis retroperitoneal, queloide, fibrosis sistémica nefrogénica, escleroderma, esclerosis sistémica, artrofibrosis, síndrome de Peyronie, contractura de Dupuytren, neuropatía diabética, capsulitis adhesiva, enfermedad hepática alcohólica, hepatoesteatosis, hepatitis viral, enfermedad biliar, hemocromatosis primaria, cirrosis relacionada con los fármacos, cirrosis criptógena, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar fibrótica humana, degeneración macular, retinopatía retinal, retinopatía vítrea, fibrosis miocárdica, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, ateroesclerosis/reestenosis, cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria y colitis colagenosa.

El método para tratar una enfermedad asociada a la fibrosis también puede comprender administrar, en combinación, de manera concurrente o secuencial, con el polipéptido de relaxina modificada, al menos un agente contra la fibrosis a tal paciente. El agente antifibrótico se puede seleccionar de nintedanib, Pirfenidone, antagonistas de LPA1, antagonistas del receptor de LPA1, análogos de GLP1, tralokinumab (IL-13, AstraZeneca), vismodegib (antagonista de

hedgehog, Roche), PRM-151 (pentraxin-2, TGF beta-1, Promedior), SAR-156597 (Mab biespecífico IL-4&IL-13, Sanofi), simtuzumab (anticuerpo de tipo anti-lisil oxidasa 2 (anti-LOXL2), Gilead), CKD-942, PTL-202 (PDE inh./pentoxifilina/NAC oral de liberación control., Pacific Ther.), omipalisib (oral PI3K/mTOR inhibidor, GSK), IW-001 (mod. de solución oral de colágeno de tipo V bovino, ImmuneWorks), STX-100 (integrin alfa V/ beta-6 ant, Stromedix/ Biogen), Actimmune (IFN gamma), PC-SOD (midismase; inhalado, LTT Bio-Pharma / CKD Pharm), lebrikizumab (mAb anti-IL-13 SC humanizado, Roche), AQX-1125 (activador de SHIP1, Aquinox), CC-539 (inhibidor de JNK, Celgene), FG-3019 (FibroGen), SAR-100842 (Sanofi) y ácido obeticólico (OCA o INT-747, Intercept).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir la insuficiencia renal, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para mejorar, estabilizar o restablecer la función renal en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada o una

composición que comprende un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para elaborar un polipéptido de relaxina modificada como se describe en la presente, que comprende: (a) proporcionar un polipéptido que comprende una cadena A de relaxina y una cadena B de relaxina, en donde el polipéptido comprende un aminoácido codificado de manera no natural; y (b) unir el aminoácido codificado de manera no natural con el mejorador farmacocinético. El aminoácido codificado de manera no natural puede estar unido a tal mejorador farmacocinético mediante un enlace oxima, por ejemplo, que una tal aminoácido codificado de manera no natural a un componente peptídico del mejorador farmacocinético. El enlace oxima se puede formar mediante la reacción de un grupo carbonilo y un grupo aminooxi. El grupo carbonilo puede ser un sustituyente del aminoácido codificado de manera no natural, y el grupo aminooxi puede ser un constituyente del mejorador farmacocinético. El grupo aminooxi puede ser un sustituyente del aminoácido codificado de manera no natural, y el grupo carbonilo puede ser un constituyente del mejorador farmacocinético, por ejemplo, un constituyente de un componente peptídico del mejorador farmacocinético. El aminoácido codificado de manera no natural se puede incorporar ribosómicamente en el

polipéptido.

II. Ácidos nucleicos recombinantes generales y métodos para usar con los polipéptidos de relaxina modificada descritos

En modalidades de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de relaxina modificada de interés se pueden aislar, clonar y, a menudo, modificar usando métodos recombinantes. Tales modalidades se pueden usar, entre otras, para la expresión de proteínas o durante la generación de variantes, derivados u otras secuencias derivadas de un polipéptido de relaxina modificada. En algunas modalidades, las secuencias que codifican los polipéptidos de relaxina modificada de la descripción se ligan operativamente a un promotor heterólogo. En algunas modalidades, el uso del codón de ADN en las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido de relaxina modificada se puede optimizar para la expresión de *E. coli* o de una célula de mamífero (por ejemplo, CHO) usando técnicas que son conocidas en el estado de la técnica

En la presente se proporcionan polinucleótidos de ejemplo que codifican una cadena A de relaxina (SEQ ID NO: 10), una cadena B de relaxina (SEQ ID NO: 11), las cadenas A y B de relaxina (SEQ ID NO: 12) y las secuencias líder (SEQ ID NO: 13-14).

Una secuencia de nucleótidos que codifica un

polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se puede sintetizar sobre la base de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen, que incluye, entre otros, tener la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4, 5, 6, 35, 36 o 37 y luego cambiar la secuencia de nucleótidos para realizar la introducción (es decir, incorporación o sustitución) o supresión (es decir, supresión o sustitución) de los residuos de aminoácidos correspondientes. La secuencia de nucleótidos se puede modificar convenientemente mediante mutagénesis dirigida al sitio de conformidad con métodos convencionales. De manera alternativa, la secuencia de nucleótidos se puede preparar mediante síntesis química, que incluye, entre otros, el uso de un sintetizador de oligonucleótidos, en donde los oligonucleótidos se diseñan en función de la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y, preferentemente, la selección de los codones que resultan favorecidos en la célula hospedera en donde se producirá el polipéptido recombinante.

Además, un codón selector que codifica un aminoácido codificado de manera no natural se puede incorporar en la secuencia de polinucleótido, como se describe adicionalmente en la presente.

La descripción también se refiere a células hospedera eucariotas, células hospedera no eucariotas y organismos para la incorporación *in vivo* de un aminoácido no

natural a través de pares de tARN/RS ortogonales. Las células hospedera se modifican por ingeniería genética (lo que incluye, entre otros, células transformadas, transducidas o transfectadas) con los polinucleótidos de la descripción o constructos que incluyen un polinucleótido de la descripción, que incluye, entre otros, un vector de la descripción, que puede ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresióNo. Por ejemplo, las regiones codificantes del tARN ortogonal, la sintetasa de tARN ortogonal y la proteína que se desea derivatizar están operativamente ligadas elementos de control de la expresión génica que son funcionales en la célula hospedera deseada. El vector puede ser, por ejemplo, en forma de un plásmido, un cósmido, un fago, una bacteria, un virus, un polinucleótido desnudo o un polinucleótido conjugado. Los vectores se pueden introducir en células y/o microrganismos mediante métodos estándares.

III. Codones selectores

Los codones selectores de la descripción expanden el marco de codón genético de la maquinaria biosintética de proteínas. Por ejemplo, un codón selector incluye, entre otros, un codón único de tres bases, un codón sin sentido, tal como un codón de detención, que incluye, entre otros, un codón ámbar (UAG), un codón ocre o un codón ópalo (UGA), un codón no natural, un codón de cuatro o más bases, un codón extraño, o similares. Resulta evidente para la persona

experta en la técnica que existe una amplia variedad de cantidad de codones selectores que pueden introducirse en un gen deseado o polinucleótido, que incluye, entre otros, 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más en un solo polinucleótido que codifica al menos una porción del polipéptido de relaxina modificada.

En una modalidad, los métodos abarcan el uso de un codón selector que es un codón de detención para la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales (es decir, codificados de manera no natural) *in vivo*. Por ejemplo, se produce un O-tARN que reconoce el codón de detención, lo que incluye, entre otros, UAG, y se aminoacila mediante un O-RS con un aminoácido no natural deseado. Este O-tARN no se reconoce mediante las aminoacil-tARN sintetasas hospedera natural. La mutagénesis dirigida al sitio convencional se puede usar para introducir el codón de detención, que incluye, entre otros, TAG, en el sitio de interés en un polipéptido de interés. Véase, por ejemplo, Sayers, J.R., et al. (1988), Nucleic Acids Res, 16:791-802. Cuando el O-RS, O-tARN y el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés se combinan *in vivo*, el aminoácido no natural se incorpora en respuesta al codón UAG para proporcionar un a polipéptido que contiene el aminoácido no natural en la posición específica.

La incorporación de aminoácidos no naturales *in*

vivo se puede realizar sin alterar de manera considerable la célula hospedera eucariota. Por ejemplo, debido a que la eficacia de supresión del codón UAG depende de la competencia entre los O-tARN, que incluye, entre otros, el tARN supresor ámbar y un factor de liberación eucariótico (que incluye, entre otros, eRF) (que se fija a un codón de detención e inicia la liberación del péptido en crecimiento desde el ribosoma), la eficacia de supresión se puede modular mediante, por ejemplo, el aumento del nivel de expresión de O-tARN y/o el tARN supresor.

Los aminoácidos no naturales también se pueden codificar con codones raros. Por ejemplo, cuando se reduce la concentración de arginina en una reacción de síntesis de proteínas *in vitro*, el codón raro de arginina, AGG, demostró ser efectiva en la inserción de Ala mediante un tARN de síntesis acilado con alanina. Véase, por ejemplo, Ma et al., Biochemistry, 32:7939 (1993). En este caso, el tARN de síntesis compite con el tARNArg natural, que existe como una especie secundaria en *Escherichia coli*.

Los codones selectores también comprenden codones prolongados, que incluyen, entre otros, codones de 4 o más bases, por ejemplo codones de 4, 5, 6 o más bases. Los ejemplos de codones de 4 bases incluyen, entre otros, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU y similares. Los ejemplos de codones de 5 bases incluyen, entre otros, AGGAC, CCCCU, CCCUC, CUAGA,

CUACU, UAGGC y similares.

En una modalidad, los codones prolongados en función de codones raros o codones sin sentido se pueden usar en la presente descripción, lo cual puede reducir la lectura completa de contrasentido y la supresión del desplazamiento del marco de lectura en otros sitios no deseados.

Para un sistema determinado, un codón selector también puede incluir uno de los codones de tres bases naturales, en donde el sistema endógeno no usa (o rara vez usa) el codón de base natural. Por ejemplo, esto incluye un sistema que carece de un tARN que reconoce el codón de tres bases natural, y/o un sistema en donde el codón de tres bases es un codón raro.

Los genes que codifican proteínas o polipéptidos de interés, tales como un polipéptido de relaxina modificada, se pueden mutagenizar mediante métodos conocidos por las personas de experiencia en la técnica y, según se describe en la presente, incluyen, por ejemplo, uno o más codones selectores para la incorporación de un aminoácido no natural. Por ejemplo, un ácido nucleico para una proteína de interés se mutageniza para incluir uno o más codones selectores, lo que permite la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales. La descripción incluye cualquiera de esas variantes, entre otras, versiones mutantes de cualquier proteína, por ejemplo, que incluye al menos un aminoácido no

natural.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de interés, tales como un polipéptido de relaxina modificada, pueden ser fácilmente mutadas para introducir una cisteína en cualquier posición deseada del polipéptido. La cisteína suele utilizarse para introducir moléculas reactivas, agua, polímeros solubles, proteínas o una amplia variedad de otras moléculas, en una proteína de interés.

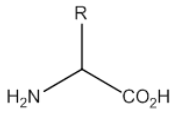
IV. Aminoácidos codificados de manera no natural

Una variedad muy amplia de aminoácidos codificados de manera no natural es adecuada para usar en la presente descripciónNo. Se puede introducir cualquier cantidad de aminoácidos codificados de manera no natural en un polipéptido de relaxina modificada. En general, los aminoácidos codificados de manera no natural introducidos son sustancialmente inertes en términos químicos con respecto a los 20 aminoácidos comunes genéticamente codificados (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina). En algunas modalidades, los aminoácidos codificados de manera no natural incluyen grupos funcionales de la cadena lateral que reaccionan de manera efectiva y selectiva con grupos funcionales no hallados en los 20 aminoácidos comunes (que

incluyen, entre otros, grupos azido, cetona, aldehído y aminooxi) para formar conjugados estables. Por ejemplo, un polipéptido de relaxina modificada que incluye un aminoácido codificado de manera no natural que contiene un grupo funcional azido se puede hacer reaccionar con un polímero o prolongador PK, o, de manera alternativa, un segundo polipéptido que contiene una porción alquino para formar un conjugado estable que se produce para la reacción selectiva de los grupos funcionales alquino y azida para formar un producto de cicloadición Huisgen [3+2].

La estructura genérica de un aminoácido alfa se ilustra de la siguiente manera (Fórmula IV):

IV



Un aminoácido codificado de manera no natural es, en general, cualquier estructura que tiene la fórmula mencionada anteriormente, en donde el grupo R es cualquier sustituyente que no se use en los 20 aminoácidos naturales, y puede ser adecuado para usar en los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripciónNo. Debido a que los aminoácidos codificados de manera no natural de la descripción difieren, en general, de los aminoácidos naturales solo en la estructura de la cadena lateral, los aminoácidos

codificados de manera no natural forman enlaces de amida con otros aminoácidos, que incluyen, entre otros, aminoácidos codificados de manera natural o no natural, de la misma manera que se forman en polipéptidos naturales. Sin embargo, los aminoácidos codificados de manera no natural tienen grupos de la cadena lateral que se distinguen de los aminoácidos naturales. Por ejemplo, R comprende, opcionalmente, un grupo alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, seleno, sulfonilo, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina, amino o similares, o cualquier combinación de estos.

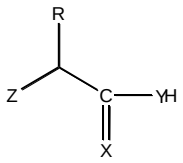
Los ejemplos de aminoácidos codificados de manera no natural que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción y que son útiles para las reacciones con prolongadores PK y polímeros soluble en aguas incluyen, entre otros, aquellos con grupos reactivos carbonilo, aminooxi, hidrazina, hidrazida, semicarbazida, azida y alquino. En algunas modalidades, los aminoácidos codificados de manera no natural comprenden una porción sacárido. Los ejemplos de estos aminoácidos incluyen *N*-acetil-L-glucosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-galactosaminil-L-serina, *N*-acetil-L-

glucosaminil-L-treonina, *N*-acetil-L-glucosaminil-L-asparagina y *O*-manosaminil-L-serina.

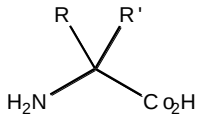
Muchos de los aminoácidos codificados de manera no natural proporcionados en la presente están disponibles en el comercio, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), Novabiochem (una división de EMD Biosciences, Darmstadt, Alemania) o Peptech (Burlington, MA, EE.UU.). Aquellos que no se encuentran disponibles en el comercio se sintetizan, opcionalmente, como se indica en la presente o mediante métodos estándares conocidos por las personas de experiencia en la técnica. Con respecto a técnicas de síntesis orgánica, véase, por ejemplo, Organic Chemistry por Fessendon y Fessendon, (1982, segunda edición, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry por March (tercera edición, 1985, Wiley and Sons, Nueva York); y Advanced Organic Chemistry por Carey y Sundberg (tercera edición, Partes A y B, 1990. Plenum Press, Nueva York). Véanse también las patentes estadounidenses No.^{os} 7.045.337 y 7.083.970. que se incorporan por referencia en la presente. Además de los aminoácidos no naturales que contienen cadenas laterales novedosas, los aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción también comprenden, opcionalmente, estructuras principales

modificadas, que incluyen, entre otras, las que se ilustran mediante las estructuras de las Fórmulas V y VI:

V



VI



en donde Z comprende, en general, OH, NH^2, SH, NH-R′ o S-R′; X e Y, que pueden ser iguales o diferentes, comprenden, en general, S u O, y R y R′, que son opcionalmente iguales o diferentes, se seleccionan, en general, de la misma lista de constituyentes para el grupo R descrito anteriormente para los aminoácidos no naturales que tienen la Fórmula I así como hidrógeno. Por ejemplo, los aminoácidos no naturales de la descripción comprenden, opcionalmente, sustituciones en el grupo amino o carboxilo, como se ilustra mediante las Fórmulas V y VI. Los aminoácidos no naturales de este tipo incluyen, entre otros, ácidos α-hidroxi, α-tioácidos, α-aminotiocarboxilatos, que incluyen, entre otros, con cadenas laterales correspondientes a los 20 aminoácidos naturales comunes o con cadenas laterales no

naturales. Asimismo, las sustituciones en α-carbono incluyen, opcionalmente, entre otros, aminoácidos L, D o α-αdisustituidos, tales como D-glutamato, D-alanina, D-metil-O-tirosina, ácido aminobutírico y similares. Otras alternativas estructurales incluyen aminoácidos cíclicos, tales como análogos de prolina, así como análogos de prolina con anillos de 3, 4, 6, 7, 8 y 9 miembros, aminoácidos β y γ, tales como β-alanina sustituida y ácido γ-aminobutírico.

Muchos aminoácidos no naturales se basan en aminoácidos naturales, tales como tirosina, glutamina, fenilalanina y similares, y son adecuados para usar en la presente descripcióNo. Los análogos de tirosina incluyen, entre otros, tirosinas parasustituidas, tirosinas ortosustituidas y tirosinas metasustituidas, en donde la tirosina sustituida comprende, entre otras, un grupo ceto (que incluye, entre otros, un grupo acetilo), un grupo benzoílo, un grupo amino, una hidrazina, una hidroxiamina, un grupo tiol, un grupo carboxi, un grupo isopropilo, un grupo metilo, un hidrocarburo C_6 - C_{20} de cadena lineal o ramificada, un hidrocarburo saturado o insaturado, un grupo O-metilo, un grupo poliéter, un grupo nitro, un grupo alquinilo o similares. Asimismo, también se contemplan anillos de arilo sustituidos de manera múltiple. Los análogos de glutamina que pueden ser adecuados para usar en la

presente descripción incluyen, entre otros, derivados de α-hidroxi, derivados sustituidos con γ, derivados cíclicos y derivados de glutamina sustituida con amida. Los ejemplos de análogos de fenilalanina que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen, entre otros, fenilalaninas parasustituidas, fenilalaninas ortosustituidas y fenilalaninas metasustituidas, en donde el sustituyente comprende, entre otros, un grupo hidroxi, un grupo metoxi, un grupo metilo, un grupo alilo, un aldehído, un azido, un iodo, un bromo, un grupo ceto (que incluye, entre otros, un grupo acetilo), un benzoílo, un grupo alquinilo o similares. Los ejemplos específicos de aminoácidos no naturales que pueden ser adecuados para usar en la presente descripción incluyen, entre otros, p-acetil-L- fenilalanina, O-metil-L-tirosina, L-3-(2-naftil)alanina, 3-metil-fenilalanina, O-4-alil-L-tirosina, 4-propil-L-tirosina, tri-O-acetil-GlcNAcβ-serina, L-dopa, fenilalanina fluorinada, isopropil-L-fenilalanina, *p*-azido-L-fenilalanina, *p*-acil-L-fenilalanina, *p*-benzoil-L-fenilalanina, L-fosfoserina, fosfonoserina, fosfonotirosina, *p*-iodo-fenilalanina, *p*-bromofenilalanina, *p*-amino-L-fenilalanina, isopropil-L-fenilalanina y p-propargiloxi-fenilalanina, y similares.

En una modalidad, se proporcionan composiciones de un polipéptido de relaxina modificada que comprenden un aminoácido no natural (tal como *p*-acetil-L-fenilalanina). Se

proporcionan también diversas composiciones que comprenden *p*-acetil-L-fenilalanina y que incluyen, entre otras, proteínas y/o células. En un aspecto, una composición que incluye el aminoácido no natural *p*-acetil-L-fenilalanina también incluye tARN ortogonal. El aminoácido no natural se puede unir (por ejemplo, de manera covalente) a tARN ortogonal, por ejemplo, se puede unir de manera covalente a tARN ortogonal mediante un enlace de amino-acilo, se puede unir de manera covalente a 3'OH o 2'OH de un azúcar ribosa terminal de tARN ortogonal, etcétera.

El polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente puede comprender un aminoácido codificado de manera no natural descrito en la patente estadounidense No.° 8.735.539, titulada "Polipéptidos de relaxina que comprenden aminoácidos codificados de manera no natural", que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

V. Estructura y síntesis de aminoácidos no naturales

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido de relaxina modificada ligado a un prolongador PK, por ejemplo, que comprende un ácido graso, mediante un enlace oxima. Muchos tipos de aminoácidos codificados de manera no natural son adecuados para formar enlaces de oxima. Estos incluyen, entre otros, aminoácidos codificados de manera no natural que contienen un grupo

carbonilo, dicarbonilo, tipo carbonilo, carbonilo oculto, carbonilo protegido, o un grupo hidroxilamina. Estos aminoácidos, así como su estructura y síntesis, se describen en las patentes estadounidenses Nos. 8,012,931 y 8,735,539, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Los ejemplos de estructuras y métodos de síntesis de aminoácidos codificados de manera no natural, que incluyen los aminoácidos que contienen hidroxilamina, se conocen en el estado de la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense No. 7,332,571, las publicaciones de patente estadounidense Nos. 2006/0194256, 2006/0217532 y 2006/0217289 y WO 2006/069246, cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad.

SÍNTESIS QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS CODIFICADOS DE MANERA NO NATURAL

Muchos de los aminoácidos no naturales adecuados para usar en la presente descripción se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, de Sigma (EE. UU.) o Aldrich (Milwaukee, WI, EE. UU.). Aquellos que no se encuentran disponibles en el comercio se sintetizan, opcionalmente, como se indica en la presente, como se indica en diversas publicaciones o mediante métodos estándares conocidos por las personas de experiencia en la técnica.

A. Grupos reactivos carbonilo

Los aminoácidos con un grupo reactivo carbonilo permiten que varias reacciones liguen moléculas (que incluyen, entre otras, PEG u otras moléculas soluble en aguas, tales como componentes peptídicos) mediante adición nucleofílica o reacciones de condensación aldólica, entre otras.

La síntesis de *p*-acetil-(+/-)-fenilalanina y *m*-acetil-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003), que se incorpora por referencia en la presente. Una persona experta en la técnica puede preparar de manera similar otros aminoácidos que contienen carbonilo.

En algunas modalidades, un polipéptido de relaxina modificada que comprende un aminoácido codificado de manera no natural se puede modificar químicamente para generar un grupo funcional carbonilo reactivo. Por ejemplo, una funcionalidad de aldehído útil para reacciones de conjugación se puede generar de una funcionalidad que tiene grupos adyacentes amino e hidroxilo.

En la presente descripción, un aminoácido codificado de manera no natural, que tiene grupos hidroxilo y amino adyacentes, se puede incorporar en el polipéptido como una funcionalidad de aldehído “oculta”. Por ejemplo, 5-hidroxilisina tiene un grupo hidroxilo adyacente a la amina

epsiloNo. Las condiciones de reacción para generar el aldehído, en general, incluyen la adición de metaperiodato de sodio en exceso molar en condiciones leves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es, en general, alrededor de 7.0. Una reacción típica incluye la adición de metaperiodato de sodio en un exceso molar de alrededor de 1,5 a una solución amortiguada del polipéptido, que luego se incubó durante alrededor de 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6,423,685, que se incorpora en la presente por referencia.

La funcionalidad de carbonilo se puede hacer reaccionar de manera selectiva con un reactivo que contiene hidrazina, hidrazida, hidroxilamina o semicarbazida en condiciones leves en una solución acuosa, para formar los enlaces de hidrazona, oxima o semicarbazona, respectivamente, que son estables en condiciones fisiológicas. Véanse, por ejemplo, Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 475-481 (1959); Shao, J. and Tam, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo permite la modificación selectiva en presencia de las otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, V. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:8150-8151 (1996); Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., *Bioconjug. Chem.* 3:138-146 (1992); Mahal, L. K., *et al.*, *Science* 276:1125-1128

(1997).

B. Grupos reactivos hidrazina, hidrazida o semicarbazida

Los aminoácidos codificados de manera no natural que contienen un grupo nucleofílico, tal como hidrazina, hidrazida o semicarbazida, permiten la reacción con varios grupos electrofílicos para formar conjugados.

Los aminoácidos que contienen hidrazida, hidrazina y semicarbazida se encuentran disponibles en fuentes comerciales. Por ejemplo, L-glutamato-γ-hidrazida se encuentra disponible de Sigma Chemical (San Luis, MO). Una persona experta en la técnica puede preparar otros aminoácidos no disponibles en el comercio. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6,281,211, que se incorpora en la presente por referencia.

Los polipéptidos de relaxina modificada que contienen aminoácidos codificados de manera no natural, que tienen funcionalidades de hidrazida, hidrazina o semicarbazida, se pueden hacer reaccionar de manera efectiva y selectiva con varias moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995). La reactividad única de los grupos funcionales hidrazida, hidrazina y semicarbazida los hace considerablemente más reactivos a aldehídos, cetonas y otros

grupos electrofílicos, en comparación con los grupos nucleofílicos presentes en los 20 aminoácidos comunes (que incluyen, entre otros, el grupo hidroxilo de serina o treonina, o los grupos amino de lisina y el N-terminal).

C. Aminoácidos que contienen aminooxi

Los aminoácidos codificados de manera no natural que contienen un grupo aminooxi (también denominado hidroxilamina) permiten la reacción con varios grupos electrofílicos para formar conjugados (por ejemplo, con PEG u otros componentes peptídicos). Como hidrazinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxi le permite reaccionar de manera eficiente y selectiva con varias moléculas que contienen aldehídos u otros grupos funcionales con actividad química similar. Véase, por ejemplo, Shao, J. and Tam, J., *J. Am. Chem. Soc.* 117:3893-3899 (1995); H. Hang and C. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 34: 727-736 (2001). Si bien el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, una oxima surge, en general, como resultado de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo, tal como cetona.

Los aminoácidos que contienen aminooxi se pueden preparar de precursores de aminoácidos de fácil acceso (homoserina, serina y treonina). Véase, por ejemplo, M. Carrasco and R. Brown, *J. Org. Chem.* 68: 8853-8858 (2003).

Determinados aminoácidos que contienen aminooxi, tales como ácido L-2-amino-4-(aminooxi)butírico, se aislaron de fuentes naturales (Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997). Una persona experta en la técnica puede preparar otros aminoácidos que contienen aminooxi.

D. Grupos reactivos azida y alquino

La reactividad única de los grupos funcionales azida y alquino los hace útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas. Las azidas orgánicas, en particular, azidas alifáticas, y alquinos, en general, son estables en condiciones químicas de reacción comunes. En particular, los grupos funcionales azida y alquino son inertes con respecto a las cadenas laterales (es decir, grupos R) de los 20 aminoácidos comunes encontrados en polipéptidos naturales. Sin embargo, al aproximarse, se revela la naturaleza "de acción por resorte" de los grupos azida y alquino, y estos reaccionan de manera selectiva y eficiente mediante la reacción de cicloadición Huisgen [3+2] para generar el triazol correspondiente. Véase, por ejemplo, Chin J., *et al.,* Science 301:964-7 (2003); Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

Dado que la reacción de cicloadición Huisgen implica una reacción de cicloadición selectiva (*véase, por ejemplo,* Padwa, A., en Comprehensive Organic Synthesis, Vol.

4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. en 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (ed. Padwa, A., 1984) , p. 1-176), más que una sustitución nucleofílica, la incorporación de aminoácidos codificados de manera no natural que tienen cadenas laterales que contienen azida y alquino permite que los polipéptidos resultantes se modifiquen de manera selectiva en la posición de los aminoácidos codificados de manera no natural. La reacción de cicloadición, que incluye un polipéptido de relaxina modificada que contiene azida o alquino, se puede realizar a temperatura ambiente en condiciones acuosas, mediante la adición de Cu(II) (por ejemplo, en forma de una cantidad catalítica de $CuSO_4$), en presencia de un agente reductor para reducir Cu(II) a Cu(I), *in situ*, en una cantidad catalítica. Véase, por ejemplo, Wang, Q., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., *et al.*, *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, *et al.*, *Angew. Chem. ed. int.* 41:2596-2599 (2002). Los ejemplos de agentes reductores incluyen, entre otros, ascorbato, cobre metálico, quinina, hidroquinona, vitamina K, glutatión, cisteína, Fe^{2+}, Co^{2+} y un potencial eléctrico aplicado.

En algunos casos, en donde se desea una reacción de cicloadición de Huisgen [3+2] entre una azida y un alquino, el polipéptido de relaxina modificada puede comprender un aminoácido codificado de manera no natural, que comprende una

porción alquino, y el mejorador PK que debe unirse al aminoácido puede comprender una porción azida. De manera alternativa, también se puede realizar la reacción inversa (es decir, con la porción azida en el aminoácido y la porción alquino en el polímero soluble en agua).

El grupo funcional azida también se puede hacer reaccionar de manera selectiva con un polímero soluble en agua que contiene un éster de arilo, y se puede funcionalizar de manera adecuada con una porción arilfosfina para generar un enlace de amida. El grupo arilfosfina reduce la azida *in situ*, y la amina resultante luego reacciona de manera eficiente con un enlace de éster próximo para generar la amida correspondiente. Véase, por ejemplo, E. Saxon y C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). El aminoácido que contiene azida puede ser una azida de alquilo (que incluye, entre otros, ácido 2-amino-6-azido-1-hexanoico) o una azida de arilo (p-azido-fenilalanina).

El grupo funcional azida también se puede hacer reaccionar de manera selectiva con un polímero soluble en agua que contiene un tioéster, y se puede funcionalizar de manera adecuada con una porción arilfosfina para generar un enlace de amida. El grupo arilfosfina reduce la azida *in situ*, y la amina resultante luego reacciona de manera eficiente con el enlace de tioéster para generar la amida correspondiente.

Los aminoácidos que contienen alquino están disponibles en el comercio. De manera alternativa, los aminoácidos que contienen alquino se pueden preparar de conformidad con métodos estándares. Por ejemplo, *p*-propargiloxifenilalanina se puede sintetizar, por ejemplo, como se describe en Deiters, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 125: 11782-11783 (2003), y 4-alquinil-L-fenilalanina se puede sintetizar como se describe en Kayser, B., *et al.*, *Tetrahedron* 53(7): 2475-2484 (1997). Una persona experta en la técnica puede preparar otros aminoácidos que contienen alquino.

Los aminoácidos que contienen azida se encuentran disponibles de fuentes comerciales. Para aquellos aminoácidos que contienen azida y no están disponibles en el comercio, el grupo azida se puede preparar de manera relativamente fácil, usando métodos estándares conocidos por las personas de experiencia en la técnica, que incluyen, entre otros, el desplazamiento de un grupo saliente adecuado (por ejemplo, haluro, mesilato, tosilato) o la apertura de una lactona protegida de manera adecuada. Véase, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry por March (tercera edición, 1985, Wiley y Sons, Nueva York).

Las moléculas que se pueden agregar a una proteína de la descripción a través de una cicloadición [3+2] incluyen casi cualquier molécula con un derivado de azida o alquinilo.

Las moléculas incluyen, entre otras, tinturas, fluoróforos, agentes de reticulación, derivados de sacárido, polímeros (que incluyen, entre otros, polímeros que comprenden polietilenglicol), fotorreticulantes, compuestos citotóxicos, etiquetas de afinidad, derivados de biotina, resinas, microesferas, un péptido, una segunda proteína o un segundo polipéptido (o más), polinucleótidos (que incluyen, entre otros, ADN, ARN, etc.), quelantes de metal, cofactores, ácidos grasos, hidratos de carbono y similares. Estas moléculas se pueden agregar a un aminoácido no natural con un grupo alquinilo, que incluye, entre otros, p-propargiloxifenilalanina, o un grupo azido, que incluye, entre otros, p-azido-fenilalanina, respectivamente.

E. Grupos reactivos aminotiol

La reactividad única de grupos funcionales aminotiol beta-sustituidos los hace útiles para la modificación selectiva de polipéptidos y otras moléculas biológicas que contienen grupos aldehído mediante la formación de tiazolidina. Véase, por ejemplo, J. Shao and J. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117 (14) 3893-3899. En algunas modalidades, los aminoácidos de aminotiol beta-sustituidos se pueden incorporar en los polipéptidos de relaxina modificada y luego hacerse reaccionar con un mejorador PK que comprende una funcionalidad aldehído. En algunas modalidades, un mejorador PK, conjugado de fármaco u otra carga útil se puede

acoplar a un polipéptido de relaxina modificada que comprende un aminoácido de aminotiol beta-sustituido mediante la formación de tiazolidina.

F. Grupos reactivos adicionales

Los grupos reactivos adicionales y aminoácidos codificados de manera no natural que se pueden incorporar en polipéptidos de relaxina modificada de la descripción, se describen en las siguientes solicitudes de patentes que se incorporan por referencia en su totalidad en la presente: la publicación de patente estadounidense No. 2006/0194256, la publicación de patente estadounidense No. 2006/0217532, la publicación de patente estadounidense No. 2006/0217289 y la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO/2007/070659.

VI. Generación *in vivo* de polipéptidos de relaxina modificada que comprenden aminoácidos codificados de manera no natural

Los polipéptidos de relaxina modificada de la descripción se pueden generar *in vivo* usando tARN y tARN sintetasas modificadas para agregar o sustituir aminoácidos que no están codificados en sistemas naturales. Estos métodos se describen en la patente estadounidense No. 8,735,539, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Los métodos para generar tARN y tARN sintetasas, que usan aminoácidos que no están codificados en sistemas

naturales, se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 7,045,337 y 7,083,970 que se incorporan en la presente por referencia. Estos métodos implican generar una maquinaria de traducción que funciona independientemente de las sintetasas y tARN endógenos al sistema de traducción (y, por lo tanto, a veces se denominan "ortogonales"). En general, el sistema de traducción comprende un tARN ortogonal (O-tARN) y una aminoacil tARN sintetasa ortogonal (O-RS). En general, la O-RS, preferentemente, aminoacila el O-tARN con al menos un aminoácido no natural en el sistema de traducción, y el O-tARN reconoce al menos un codón selector que otros tARN no reconocen en el sistema. De esta manera, el sistema de traducción inserta el aminoácido codificado de manera no natural en una proteína producida en el sistema, en respuesta a un codón selector codificado, y así "sustituye" un aminoácido en una posición en el polipéptido codificado.

El uso de O-tARN/aminoacil-tARN sintetasas incluye la selección de un codón específico que codifica el aminoácido codificado de manera no natural. Si bien se puede usar cualquier codón, en general, es conveniente seleccionar un codón que se usa con poca frecuencia o que no se usa nunca en la célula en la que se expresa O-tARN/aminoacil-tARN sintetasa. Los ejemplos de codones incluyen codones sin sentido, tales como codones de detención (ámbar, ocre y ópalo), cuatro o más codones de inicio y otros codones

naturales de tres bases que no se usan o se usan con poca frecuencia.

Los codones selectores específicos se pueden introducir en posiciones adecuadas en la secuencia codificante del polinucleótido de relaxina modificada usando métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica (que incluyen, entre otros, mutagénesis específica de sitio, mutagénesis por inserción de un casete, mutagénesis de restricción y selección, etc.).

VII. Expresión en no eucariotas y eucariotas

Sistemas de expresión, cultivo y aislamiento

Los polipéptidos de relaxina modificada o no modificada se pueden expresar en cualquier cantidad de sistemas de expresión adecuados que incluyen, por ejemplo, levadura, células de insecto (por ejemplo, células de insecto infectadas por baculovirus), células de mamífero y bacterias. A continuación, se proporciona una descripción de sistemas de expresión de ejemplo.

Levadura: Como se usa en la presente, el término "levadura" incluye cualquiera de las diversas levaduras capaces de expresar un gen que codifica un polipéptido de relaxina modificada, que incluyen, entre otros, *P. pastoris*, *P. guillerimondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa* y

H. polymorpha. WO 2005/091944, que se incorpora por referencia en la presente, describe la expresión de relaxina en levadura.

E. Coli, especies de *Pseudomonas* y otras procariotas:

La expresión "hospedera bacteriano" o "célula hospedera bacteriana" se refiere a una bacteria que se puede usar, o se usó, como un receptor para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula hospedera bacteriana original que se transfectó. Cabe destacar que la progenie de una sola célula parental puede no ser necesariamente idéntica por completo a la célula parental original en cuanto a la morfología o al complemento de ADN genómico o total, debido a una mutación accidental o deliberada. La progenie de la célula parental que es lo suficientemente similar a la célula parental para que se caracterice por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de relaxina modificada o no modificada, se incluye en la progenie que tiene por fin la presente definicióNo.

En la selección de hospederaes bacterianos para la expresión, los hospederaes adecuados pueden incluir aquellos que muestran tener, entre otros, buena capacidad de formación de cuerpos de inclusión, baja actividad proteolítica y solidez general. En general, la fermentación

industrial/farmacéutica usa bacterias derivadas de cepas K (por ejemplo, W3110) o bacterias derivadas de cepas B (por ejemplo, BL21). Otros ejemplos de hospederaes de *E. coli* adecuados incluyen, entre otros, cepas de BL21, DH10B, o sus derivados. En otra modalidad de los métodos de la presente descripción, el hospedera de *E. coli* es una cepa deficiente en proteasas que incluyen, entre otras, OMP y LONo. La cepa de la célula hospedera puede ser una especie de *Pseudomonas*, que incluye, entre otras, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*. Se sabe que el biovar 1 de *Pseudomonas fluorescens*, designada como cepa MB101, es útil para la producción recombinante y está disponible para los procesos terapéuticos de producción de proteínas.

Una vez que una cepa de la célula hospedera recombinante se estableció (es decir, el constructo de expresión se introdujo en la célula hospedera, y las células hospedera con el constructo de expresión adecuado se aislaron), la cepa de la célula hospedera recombinante se cultiva en condiciones adecuadas para la producción de polipéptidos de relaxina modificada.

Las células hospedera recombinantes se pueden cultivar en formatos continuos o de lote, con la cosecha de células (en el caso donde el polipéptido de relaxina modificada se acumula de manera intracelular) o la cosecha de

sobrenadante de cultivo en formatos continuos o de lote.

Los polipéptidos de relaxina modificada producidos en células hospedera bacterianas pueden ser poco solubles o insolubles (en forma de cuerpos de inclusión). En una modalidad de la presente descripción, las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar fácilmente en el polipéptido de relaxina modificada, y, por lo tanto, se seleccionan para aumentar la solubilidad de la proteína producida de manera recombinante. El polipéptido de relaxina modificada se puede solubilizar, por ejemplo, con urea o guanidina clorhidrato.

En el caso de una proteína relaxina modificada soluble, la relaxina se puede segregar en el espacio periplásmico o en el medio de cultivo. Por ejemplo, la relaxina modificada se segrega en el espacio periplásmico de las células W3110-B2 usando plásmidos que codifican constructos que incluyen 8 secuencias líder diferentes, que incluyen aquellas enumeradas en SEQ ID NO: 39-44, y transformando aquellos en células W3110-B2; luego las células se cultivaron a 37 ˚C hasta que la OD alcanzó alrededor de 0.8, en cuyo punto la expresión se indujo con 0.01 % de arabinosa. Luego de 5 horas, las muestras de liberación periplásmica se pueden preparar de los cultivos. Asimismo, la relaxina modificada soluble puede estar presente en el citoplasma de las células hospedera. Puede ser conveniente concentrar la relaxina modificada soluble antes de realizar

las etapas de purificación.

Cuando el polipéptido de relaxina modificada se produce como una proteína de fusión, la secuencia de fusión se puede eliminar. La supresión de una secuencia de fusión se puede lograr mediante escisión enzimática o química. La supresión enzimática de secuencias de fusión se puede lograr usando métodos conocidos por la persona experta en la técnica. La elección de enzimas para la supresión de la secuencia de fusión se puede determinar mediante la identidad de la fusión, y las condiciones de reacción se pueden especificar mediante la elección de enzimas, como será evidente para la persona experta en la técnica. La escisión química se puede lograr usando reactivos conocidos por la persona experta en la técnica, que incluyen, entre otros, bromuro de cianógeno, proteasa TEV y otros reactivos. El polipéptido de relaxina modificada escindido se puede purificar de la secuencia de fusión escindida mediante los métodos conocidos por la persona experta en la técnica.

En general, se desea ocasionalmente desnaturalizar y reducir los polipéptidos expresados y luego hacer que los polipéptidos se vuelvan a plegar en la conformación preferida. Por ejemplo, se pueden agregar guanidina, urea, DTT, DTE y/o una chaperonina a un producto de traducción de interés. Las proteínas se pueden volver a plegar en un amortiguador redox que contiene, entre otros, glutatión

oxidado y L-arginina. Los reactivos de replegamiento se pueden hacer fluir o, de otra manera, mover para que entren en contacto con uno o más polipéptidos u otro producto de expresión, o viceversa.

En el caso de la producción procariótica del polipéptido de relaxina modificada, el polipéptido de relaxina modificada así producido se puede plegar de manera incorrecta y, por lo tanto, tiene menor actividad biológica o carece de esta. La bioactividad de la proteína se puede recuperar mediante el "replegamiento". En general, el polipéptido de relaxina modificada o no modificada mal plegado se vuelve a plegar mediante la solubilización (en donde el polipéptido de relaxina modificada también es insoluble), el desplegamiento y la reducción de la cadena de polipéptidos usando, por ejemplo, uno o más agentes caotrópicos (por ejemplo, urea y/o guanidina) y un agente reductor capaz de reducir puentes disulfuro (por ejemplo, ditiotreitol, DTT o 2-mercaptoetanol, 2-ME). En una concentración moderada de caotrópicos, luego se agrega un agente de oxidación (por ejemplo, oxígeno, cistina o cistamina), que permite que se vuelvan a formar puentes disulfuro. El polipéptido de relaxina modificada se puede volver a plegar usando los métodos estándares conocidos en el estado de la técnica, tales como los descritos en las patentes estadounidenses Nos. 4,511,502, 4,511,503 y

4,512,922, que se incorporan en la presente por referencia. El polipéptido de relaxina modificada también se puede coplegar con otras proteínas para formar heterodímeros o heteromultímeros.

Después del replegamiento, la relaxina modificada se puede purificar adicionalmente. La purificación de la relaxina modificada se puede lograr usando diversas técnicas conocidas por la persona experta en la técnica, que incluyen cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, cromatografía de afinidad y similares, o cualquier combinación de estos. La purificación adicional también puede incluir una etapa de secado o precipitación de la proteína purificada.

Después de la purificación, la relaxina modificada se puede intercambiar en diferentes amortiguadores y/o se puede concentrar mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica, que incluyen, por ejemplo, diafiltración y diálisis. La relaxina modificada que se proporciona como una sola proteína purificada se puede someter a agregación y precipitacióNo.

La relaxina modificada purificada puede ser al menos 90 % pura (como se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, RP-HPLC, o

electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, SDS-PAGE) o al menos 95 % pura, o al menos 98 % pura, o al menos 99 % pura o más. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza de la relaxina modificada, la relaxina modificada es lo suficientemente pura como para que se use como un producto farmacéutico o para procesamiento adicional, tal como la conjugación con un mejorador PK.

Determinadas moléculas de relaxina modificada se pueden usar como agentes terapéuticos en ausencia de otros ingredientes activos o proteínas (que no sean excipientes, portadores, estabilizantes, albúmina de suero y similares), o pueden formar un complejo con otra proteína o un polímero.

En algunas modalidades de la presente descripción, el rendimiento de la relaxina modificada, después de cada etapa de purificación, puede ser de al menos alrededor de 30 %, al menos alrededor de 35 %, al menos alrededor de 40 %, al menos alrededor de 45 %, al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 55 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 65 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 91 %, al menos alrededor de 92 %, al menos alrededor de 93 %, al menos alrededor de 94 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 96 %, al menos alrededor de 97 %, al menos alrededor de 98 %, al menos

alrededor de 99 %, al menos alrededor de 99.9 % o al menos alrededor de 99.99 % de la relaxina modificada o no modificada en el material de inicio para cada etapa de purificación.

VIII. Expresión en sistemas alternativos

Los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripción se pueden expresar usando un sistema de traducción libre de células (por ejemplo, *in vitro*). Los sistemas de traducción pueden ser celulares o libres de células, procarióticos o eucarióticos. Los sistemas de traducción celulares incluyen, entre otros, preparaciones de células completas, tales como células o cultivos celulares permeabilizados, en donde una secuencia de ácido nucleico deseada se puede transcribir a mARN, y mARN puede ser traducido. Los sistemas de traducción libres de células están disponibles en el comercio, de los cuales se conocen diversos tipos y sistemas. Algunos ejemplos de sistemas libres de células incluyen, entre otros, lisados procarióticos, tales como lisados de *Escherichia coli*, y lisados eucarióticos, tales como extractos de germen de trigo, lisados de células de insectos, lisados de reticulocitos de conejos, lisados de oocitos de conejos y lisados de células humanas. Los extractos membranosos, tales como los extractos pancreáticos caninos que contienen membranas microsomales, también se encuentran disponibles y son útiles para traducir proteínas

secretoras.

IX. Proteínas de fusión que contienen polipéptidos de relaxina modificada

La descripción también proporciona polipéptidos de relaxina modificada, o fragmentos de estos, que comprenden la secuencia del polipéptido de relaxina modificada y un componente de fusióNo. El componente de fusión puede conferir una propiedad funcional, que incluye, entre otras, la prolongación de la semivida, facilitar la purificación y/o fabricación de proteínas, propiedades biofísicas mejoradas, tales como el aumento de la solubilidad o estabilidad, e inmunogenicidad o toxicidad reducidas, o cualquier otro fiNo. Por ejemplo, la proteína de fusión puede exhibir semivida *in vivo* prolongada y, de esta manera, facilitar una dosis menos frecuente (por ejemplo, una dosis dos veces por semana, una vez por semana o una vez cada dos semanas, etc.) en un régimen terapéutico. Las proteínas de fusión de ejemplo comprenden una relaxina modificada fusionada a un componente de fusión, tal como una albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), adnectina de prolongación de farmacocinética (PKE), XTEN, dominio Fc, una región constante de la inmunoglobulina o un fragmento o una combinación de cualquiera de los anteriores. Una proteína de fusión se puede producir expresando un ácido nucleico que codifica la secuencia del

polipéptido de relaxina modificada y la secuencia de un componente de fusión en el mismo marco de lectura, opcionalmente separados por una secuencia que codifica un péptido de conexióNo. La proteína de fusión puede comprender el polipéptido de relaxina modificada y el componente de fusión en cualquier orden, por ejemplo, uno o más componentes de fusión ligados al N-terminal y/o al C-terminal de la secuencia del polipéptido de relaxina modificada, o uno o más componentes de fusión ligados al N-terminal y al C-terminal.

X. Glucosilación de polipéptidos de relaxina modificada y no modificada

La presente descripción incluye polipéptidos de relaxina modificada que comprenden uno o más aminoácidos codificados de manera no natural que tienen residuos de sacáridos. Los residuos de sacáridos pueden ser naturales (que incluyen, entre otros, N-acetilglucosamina) o no naturales (que incluyen, entre otros, 3-fluorogalactosa). Los sacáridos pueden estar ligados a los aminoácidos codificados de manera no natural ya sea por un enlace glucosídico ligado por N u O (que incluye, entre otros, N-acetilgalactosa-L-serina) o un enlace no natural (que incluye, entre otros, una oxima o el glucósido unido por C o S correspondiente).

Las porciones sacárido (que incluyen, entre otras, glicosilo) se pueden agregar a polipéptidos de relaxina

modificada ya sea *in vivo* o *in vitro*. En algunas modalidades de la presente descripción, un polipéptido de relaxina modificada que comprende un aminoácido codificado de manera no natural que contiene carbonilo se puede modificar con un sacárido derivatizado con un grupo aminooxi para generar el polipéptido glucosilado correspondiente ligado mediante un enlace de oxima. Una vez que se unió al aminoácido codificado de manera no natural, el sacárido se puede elaborar adicionalmente mediante tratamiento con glicosiltransferasas y otras enzimas para generar un oligosacárido unido al polipéptido de relaxina modificada. Véase, por ejemplo, H. Liu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 1702-1703 (2003).

XI. Administración y composiciones farmacéuticas

En la presente, también se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de relaxina modificada, descrito en la presente, y un portador o excipiente aceptable farmacéuticamente aceptable. El portador o excipiente incluye, entre otros, solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa, sacarosa, histidina, agua, glicerol, PS80 (polisorbato 80), etanol y/o combinaciones de estos. La formulación se prepara según el modo de administración.

Por ejemplo, un polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se puede administrar a un paciente en una concentración de entre 0.1 y 100 mg/kg de peso corporal

del paciente receptor. En una modalidad, un polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se puede administrar a un paciente en una concentración de entre 0.5-5 mg/kg de peso corporal del paciente receptor. En otra modalidad, un polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se puede administrar a un paciente receptor con una frecuencia de entre una vez por día y una vez cada dos semanas, tres semanas o cuatro semanas, por ejemplo, alrededor de una vez por semana o dos veces por semana, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días o una vez cada seis días. En otra modalidad, un polipéptido de relaxina modificada descrito en la presente se puede administrar a un paciente una vez por semana.

Debe comprenderse que la concentración del polipéptido de relaxina modificada administrado a un paciente determinado puede ser mayor o menor que las concentraciones de administración de ejemplo establecidas anteriormente.

En función de la información proporcionada en la presente descripción, una persona experta en la técnica será capaz de determinar una dosis y frecuencia de administración eficaces mediante experimentos de rutina, por ejemplo, guiándose por la descripción en la presente y las explicaciones en Goodman *et al.*, (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Nueva York:

McGraw-Hill; o Howland *et al.*, (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins.

Las cantidades promedio de relaxina modificada pueden variar y, en particular, deben basarse en las recomendaciones y la receta de un médico calificado. La cantidad exacta de relaxina modificada es una cuestión de preferencia sujeta a factores, tales como el tipo exacto de afección que se trata, la afección del paciente que se trata, así como los otros ingredientes de la composicióNo. La presente descripción también proporciona la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de otro agente activo. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad que debe administrarse.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un mamífero. Estas composiciones se pueden formular específicamente para la administración mediante una o más mediantes de administración, que incluyen, entre otras, bucal, epicutánea, epidural, inhalación, intraarterial, intracardíaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal mediante un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Además,

la administración puede ser mediante inyección, polvo, líquido, gel, gotas y otros medios de administración.

Como se usa en la presente, un "portador aceptable farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes demoradores de la absorción e isotónicos, que son fisiológicamente compatibles. En una modalidad, el portador es adecuado para la administración parenteral. En otra modalidad, el portador es adecuado para la administración subcutánea. De manera alternativa, el portador puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o sublingual. Los portadores aceptables farmacéuticamente aceptable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede estar presente en una forma liofilizada. La composición se puede formular como solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para proporcionar una concentración farmacológica alta. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de estos. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un

estabilizador. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un agente isotónico, por ejemplo, azúcares, tales como sacarosa, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composicióNo. Al incluir un agente tal como sales de monoestearato y gelatina, la absorción de las composiciones inyectables se puede prolongar. Además, el polipéptido se puede formular en una formulación de liberación programada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que pueden proteger el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliglicólicos polilácticos (PLG).

Los polipéptidos de relaxina modificada y las composiciones de la presente descripción se pueden administrar mediante cualquier mediante de administración convencional adecuada para proteínas o péptidos, que incluyen, entre otras, inyecciones, por ejemplo,

parenterales, e incluyen, entre otras, subcutáneas o intravenosas, o cualquier otra forma de inyección o infusióNo. Las composiciones de polipéptidos se pueden administrar mediante varias mediantes de administración, que incluyen, entre otras, la administración por mediante oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, subcutánea, tópica, sublingual o rectal. Las composiciones que comprenden relaxina modificada también se pueden administrar mediante liposomas. El polipéptido de relaxina modificada se puede usar solo o combinado con otros componentes adecuados, tales como un portador farmacéutico. El polipéptido de relaxina modificada se puede usar en combinación con otros agentes como se describe en la presente.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, por mediante de administración intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación se torne isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservadores. Las formulaciones

de relaxina modificada se pueden presentar en recipientes sellados de dosis única o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente descripción, es suficiente para tener una respuesta terapéutica favorable en el paciente en el transcurso de un tiempo, u otra actividad adecuada, según la aplicaciónNo. La dosis se determina por la eficacia de la formulación, y la actividad, estabilidad o semivida en suero del polipéptido de relaxina modificada usado y el estado del paciente, así como el peso corporal o área de superficie del paciente que se trata.

La dosis administrada, por ejemplo, a un paciente de 70 kilogramos, está, en general, dentro del intervalo equivalente a las dosificaciones de proteínas terapéuticas que se usan en la actualidad, ajustada según la actividad alterada o la semivida en suero de la composición relevante.

Para la administración, las formulaciones de la presente descripción se administran a una frecuencia determinada por la LD-50 o ED-50 de la formulación relevante y/o la observación de cualquier efecto secundario de los polipéptidos de relaxina modificada en diversas concentraciones, que incluyen, entre otras, como se aplican a la masa y a la salud general del paciente. La administración se puede lograr mediante una dosis única o dosis divididas.

Los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripción se pueden administrar directamente a un sujeto que es un mamífero. Los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripción se pueden preparar en una mezcla en una forma inyectable de dosis unitaria (que incluye, entre otras, solución, suspensión o emulsión) con un portador aceptable farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripción también se pueden administrar mediante infusión continua (usando, entre otros, minibombas, tales como bombas osmóticas), un solo bolo o formulaciones de depósitos de liberación lenta.

Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación se torne isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservadores. Las soluciones y suspensiones se pueden preparar de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

Los portadores aceptables farmacéuticamente aceptable incluyen, entre otros, amortiguadores que contienen succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina,

imidazol, acetato, bicarbonato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen, entre otros, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular, que incluyen, entre otros, aquellos con menos de alrededor de 10 residuos; proteínas, que incluyen, entre otros, albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, que incluyen, entre otros, polivinilpirrolidona; aminoácidos, que incluyen, entre otros, glicina, glutamina, asparagina, arginina, histidina o derivados de histidina, metionina, glutamato o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen, entre otros, trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, que incluyen, entre otros, EDTA y edentato disódico; iones metálicos divalentes, que incluyen, entre otros, zinc, cobalto o cobre; alcoholes de azúcar, que incluyen, entre otros, manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, que incluyen, entre otros, sodio y cloruro de sodio; y/o tensioactivos no iónicos, que incluyen, entre otros, Tween™ (que incluye, entre otros, Tween 80 (polisorbato 80 o PS80) y Tween 20 (polisorbato 20), Pluronics™ y otros ácidos plurónicos, que incluyen, entre otros, otros ácidos plurónicos, que incluyen, entre otros, ácido plurónico F68 (poloxámero 188) o PEG. Los tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, poliéteres a base de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno), es decir,

(PEO-PPO-PEO), o poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), es decir, (PPO-PEO-PPO), o una combinación de estos. PEO-PPO-PEO y PPO-PEO-PPO están disponibles en el comercio con las marcas Pluronics™, R-Pluronics™, Tetronics™ y R-Tetronics™ (BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.) y se describen con más detalle en la patente estadounidense No.° 4,820.352 que se incorpora en la presente en su totalidad por referencia. Otros polímeros en bloque de etileno/polipropileno pueden ser tensioactivos adecuados. Un tensioactivo o una combinación de tensioactivos se pueden usar para estabilizar la relaxina modificada pegilada contra uno o más tipos de estrés, que incluyen, entre otros, el estrés que resulta de la agitacióNo. Algunos de los anteriores se pueden denominar "agentes volumétricos". Algunos también se pueden denominar "modificadores de la tonicidad". Los conservadores antimicrobianos también se pueden aplicar para lograr la estabilidad del producto y eficacia antimicrobiana; los conservadores adecuados incluyen, entre otros, alcohol de bencilo, cloruro de benzalconio, metacresol, metil/propil parabeno, cresol y fenol, o una combinación de estos. En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede comprender un amortiguador que contiene succinato, fosfato, borato, HEPES, citrato, histidina, imidazol, acetato, bicarbonato y/u otros ácidos orgánicos; un carbohidrato (por ejemplo, monosacáridos,

disacáridos y otros carbohidratos), tales como trehalosa, sacarosa, glucosa, manosa o dextrina; y un tensioactivo, tal como Tween™ 80 (polisorbato 80 o PS80) o Tween 20 (polisorbato 20). En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede comprender un amortiguador que contiene histidina, un carbohidrato, tal como sacarosa, y un tensioactivo, tal como PS80.

Los polipéptidos de relaxina modificada de la presente descripción, que incluyen aquellos ligados a un mejorador PK también se pueden administrar mediante sistemas de liberación sostenida o como parte de estos. Las composiciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos de diferentes formas, que incluyen, entre otros, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen materiales biocompatibles, tales como poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), etileno vinil acetato (o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polianhídridos de poliláctido coglicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos, tales como

fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto encapsulado en liposomas.

La dosis administrada a un paciente en el contexto de la presente descripción debe ser suficiente para causar una respuesta favorable en el sujeto en el transcurso del tiempo. En general, la cantidad total efectiva farmacéuticamente aceptable del polipéptido de relaxina modificada de la presente descripción que se administra por mediante parenteral (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) por dosis puede estar en el intervalo de alrededor de 0.01 µg/kg a alrededor de 500 mg/kg, alrededor de 0.01 µg/kg a alrededor de 100 mg/kg, alrededor de 0.05 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, alrededor de 100 µg/kg a alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 0.2 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg o alrededor de 0.5 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, o es de alrededor de 0.5 mg/kg, alrededor de 1 mg/kg, alrededor de 2 mg/kg, alrededor de 3 mg/kg, alrededor de 4 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg, alrededor de 6 mg/kg, alrededor de 7 mg/kg, alrededor de 8 mg/kg, alrededor de 9 mg/kg, alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 12 mg/kg, alrededor de 15 mg/kg, alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 40 mg/kg, alrededor de 50 mg/kg o alrededor de 100 mg/kg, del peso corporal del paciente, aunque esto está sujeto al criterio

terapéutico. En algunas modalidades, el polipéptido de relaxina modificada de la presente descripción que se administra por mediante parenteral (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) por dosis puede estar en el intervalo de alrededor de alrededor de 0.2 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, 0.5 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg, o 1 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg, o es de alrededor de 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg o 80 mg/kg. En algunas modalidades, el polipéptido de relaxina modificada de la presente descripción que se administra por mediante parenteral (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) por dosis puede ser de alrededor de 1 mg/kg. En algunas modalidades, el polipéptido de relaxina modificada de la presente descripción que se administra por mediante parenteral (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) por dosis puede ser una dosis fija en el intervalo de alrededor de 0.1 mg a alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 1 mg a alrededor de 5000 mg, de alrededor de 10 mg a alrededor de 2500 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 1000 mg, de alrededor de 200 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 1 mg a alrededor de 10 mg, de alrededor de 10 mg a alrededor de 50 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 100 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 300 mg, de

alrededor de 300 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 700 mg a alrededor de 900 mg, de alrededor de 900 mg a alrededor de 1200 mg, de alrededor de 1000 mg a alrededor de 2000 mg, de alrededor de 2000 mg a alrededor de 3000 mg, de alrededor de 3000 mg a alrededor de 4000 mg, de alrededor de 4000 mg a alrededor de 5000 mg, de alrededor de 5000 mg a alrededor de 6000 mg, de alrededor de 6000 mg a alrededor de 7000 mg, de alrededor de 7000 mg a alrededor de 8000 mg, de alrededor de 8000 mg a alrededor de 9000 mg, o de alrededor de 9000 mg a alrededor de 10.000 mg.

XII. Usos terapéuticos de polipéptidos de relaxina modificada

La presente descripción proporciona el uso de polipéptidos de relaxina modificada en el tratamiento de enfermedades que incluyen enfermedad cardiovascular o enfermedad fibrótica, tal como insuficiencia cardíaca, pancreatitis, inflamación, cáncer, escleroderma, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática o fibrosis cardíaca.

La enfermedad cardiovascular puede incluir, entre otros, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, arritmia o frecuencias cardíacas anormales, insuficiencia cardíaca, enfermedad de la válvula cardíaca, enfermedad cardíaca congénita, miocardiopatía (enfermedad del músculo cardíaco),

enfermedad pericárdica, enfermedad de la aorta, síndrome de Marfan o enfermedad vascular (enfermedad de los vasos sanguíneos).

En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome cardiorrenal, insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, tal como insuficiencia cardíaca descompensada posaguda, insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada a defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada a defectos de la válvula cardíaca, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, angina, hipertensión, hipertensión pulmonar o hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada a defectos combinados de la válvula cardíaca, inflamación miocárdica (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca

diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada a trastornos del almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, disfunción diastólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión conservada (HFpEF) o insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión reducida (HFrEF).

En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca se selecciona de insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión reducida (HFrEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar. En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca se selecciona de insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome cardiorrenal e insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal.

La fibrosis es la formación de un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. El exceso en el depósito de tejido fibroso se asocia a las condiciones

patológicas que pueden producir una disfunción orgánica o tisular. Los órganos afectados pueden incluir pulmones (fibrosis pulmonar o de pulmón), hígado (fibrosis hepática o de hígado), riñón (fibrosis renal o de riñón) y corazón (fibrosis cardíaca). La fibrosis también puede afectar otros tejidos y órganos que incluyen articulaciones, piel, intestino, médula ósea, entre otros. Algunos ejemplos de afecciones o enfermedades fibróticas incluyen, entre otras, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que afecta al hígado; enfermedad renal diabética o nefropatía diabética, que afecta al riñón; e insuficiencia cardíaca metabólica, que afecta al corazóNo. Por ejemplo, NASH se caracteriza por la presencia de grasa, inflamación y daño en el hígado en personas que consumen poco o nada de alcohol y puede producir cirrosis hepática. NASH tiende a diagnosticarse en personas de meobjetivo edad obesas o con sobrepeso, que suelen tener niveles altos de lípidos en sangre y diabetes o prediabetes.

La actividad biológica de los polipéptidos de relaxina modificada para posible uso terapéutico se puede determinar mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos o estándares. Los polipéptidos de relaxina se pueden analizar para determinar la actividad biológica mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Tales ensayos incluyen, entre otros, ensayos de fijación al receptor.

Con respecto a enfermedades tales como

insuficiencia cardíaca y enfermedad fibrótica, la actividad de una relaxina modificada se puede determinar usando uno o más ensayos *in vivo*. En general, estos ensayos implican la administración de una relaxina en un modelo de animal de tal enfermedad y la determinación del efecto sobre la progresión de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad u otros indicios de tratamiento efectiva. Tales ensayos se pueden usar para determinar dosis eficaces y regímenes de tratamiento en el sistema modelo y, en función de esto, predecir un régimen de dosificación para uso clínico, por ejemplo, para pacientes humanos. Los ejemplos de ensayos de HF que se pueden utilizar incluyen: 1) el modelo de ratón con ligadura coronaria descendente anterior izquierda (LAD) que imita los cambios cardíacos de pacientes que padecen un infarto de miocardio y la progresión a HF (Samuel et al., Lab. Investigation 91:675-690. 2011); 2) el modelo limitado de infusión de AngII en donde se usan concentraciones mínimas de AngII para inducir la fibrosis cardíaca (Xu et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 51:62–70. 2008); 3) el modelo de rata Dahl-sensible a la sal que se caracteriza por hipertensión, insuficiencia renal y sobrecarga del volumen sanguíneo (Sakata et al., Circulation 109:2143-2149, 2004); 4) el modelo de rata espontáneamente hipersensible (SHR) vieja con fibrosis cardíaca y renal que se utilizó anteriormente para demostrar la eficacia de WT-RLX (Lekgabe et al., Hypertension

46:412-418, 2005); y 5) el modelo de rata con constricción de la aorta torácica de sobrecarga de presión (Kuster et al., Circulation 111:420-427, 2005). Además de estos modelos, la actividad de relaxinas modificadas también se puede determinar en un modelo canino, tal como en perros normales y con HF inducida por electroestimulación cardíaca. Asimismo, estos ensayos se pueden realizar para determinar si una relaxina modificada es efectiva cuando se administra, no solo a modo de prevención, sino también a modo de tratamiento. Además, las relaxinas modificadas se pueden evaluar en modelos de fibrosis que incluyen fibrosis renal (Yoshida et al., Nephrol. Dialysis Transplant 27: 2190–2197, 2012), pulmonar (Huang et al., Am. J. Pathol. 179:2751–2765, 2011) y hepática (Williams et al., Gut 49:577–583, 2001). Por ejemplo, la eficacia de una relaxina modificada se puede comparar con la eficacia de una relaxina de tipo silvestre (por ejemplo, una relaxina humana de tipo silvestre).

Las cantidades administradas de relaxina, polipéptidos de relaxina y/o análogos de relaxina de la presente invención pueden variar y, en particular, deben basarse en las recomendaciones y la receta de un médico calificado. La cantidad exacta de relaxina, polipéptidos de relaxina y/o análogos de relaxina de la presente invención es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto y/o la gravedad de la afección que se trata, la

afección del paciente que se trata, así como los otros ingredientes de la composicióNo. La invención también puede proporcionar la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de otro agente activo. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad que debe administrarse en función del tratamiento con relaxina, los tratamientos con relaxina disponibles y/u otros análogos de relaxina.

Los compuestos de la presente descripción se pueden usar para reducir el área de miocardio afectada por un infarto y para la profilaxis de infartos secundarios. También se proporciona el uso de los compuestos de la presente descripción para la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos tromboembólicos, daño por isquemia-revascularización, lesiones micro- y macrovasculares (vasculitis), trombosis arterial y venosa, edemas, isquemias, tales como infarto de miocardio, apoplejía y accidentes isquémicos transitorios, para la protección cardíaca relacionada con operaciones de derivacón coronario (injerto de derivacón coronario, CABG), angioplastias coronarias trasluminales percutáneas (PTCA), PTCA posteriores a la trombólisis, PTCA de rescate, trasplantes cardíacos y operaciones a corazón abierto, y para la protección de órganos relacionada con trasplantes, operaciones de derivacón, exámenes de catéter y otros procedimientos

quirúrgicos. También se proporciona el uso de los compuestos de la presente descripción para la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos respiratorios, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis crónica, COPD), asma, enfisema pulmonar, bronquiectasia, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular, hipertensión arterial pulmonar.

Las modalidades de ejemplo de la presente descripción proporcionan el uso de una relaxina modificada de la descripción como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades renales, que incluyen, entre otras, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencias renales agudas y crónicas, así como insuficiencia renal aguda y crónica, lo que incluye etapas agudas y crónicas de insuficiencia renal con y sin el requisito de diálisis, así como las enfermedades renales subyacentes o relacionadas, tales como hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis primaria, secundaria, al igual que aguda y crónica, glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, síndrome de Alport, glomeruloesclerosis, enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, tales como enfermedades primarias y congénitas del riñón, inflamación renal, enfermedades

inmunitarias renales, como el rechazo del trasplante de riñón, enfermedades renales inducidas por el complejo inmunitario, al igual que las enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensa, síndrome nefrótico, que se caracterizan y se asocian mediante diagnóstico con una reducción anormal de la depuración de creatinina y/o la excreción de agua, aumento anormal de concentraciones en sangre de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de enzimas renales, tales como glutamilsintetasa, osmolaridad de la orina y volumen de la orina, aumento de la microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolares, dilatación tubular, hiperfosfatemia y/o el requisito de diálisis.

Además, una relaxina modificada de la descripción se puede usar como medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de carcinomas renales, después de la resección incompleta del riñón, deshidratación después del abuso de diuréticos, aumento descontrolado de la presión sanguínea con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, así como enfermedades sistémicas asociadas al daño glomerular, tales como estenosis arterial renal, trombosis arterial renal, trombosis venosa renal,

nefropatía inducida por analgésicos y acidosis tubular renal.

Asimismo, la presente descripción proporciona el uso de una relaxina modificada de la descripción como un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico y dislipidemia.

Además, la presente descripción proporciona el uso de una relaxina modificada de la descripción como un medicamento para la profilaxis, el alivio y/o el tratamiento de las secuelas o los síntomas asociados a las enfermedades renales agudas y/o crónicas, tales como edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, perturbaciones electrolíticas (por ejemplo, hipercalemia, hiponatremia), así como metabolismo óseo y de los carbohidratos.

Además, la presente descripción proporciona el uso de una relaxina modificada de la descripción como un medicamento para mejorar, estabilizar o restablecer la función renal en un paciente que lo necesita, por ejemplo, un paciente que tiene una enfermedad renal como se describió anteriormente.

Otras modalidades de ejemplo proporcionan el uso de la relaxina modificada para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades pulmonares, en especial, de trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otras

formas de hipertensión pulmonar (PH), que incluyen enfermedad del ventrículo izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolias (CTEPH), sarcoidosis, COPD o hipertensión pulmonar asociada a la fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), deficiencia de alfa-1 antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar (por ejemplo, enfisema pulmonar inducido por humo de cigarrillos) y fibrosis quística (CF).

Otras modalidades de ejemplo proporcionan el uso de la relaxina modificada para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos fibróticos, que incluyen trastornos fibróticos de los órganos internos, tales como el pulmón, el corazón, el riñón, la médula ósea y, en particular, el hígado, y también fibrosis dermatológica y trastornos de fibrosis ocular.

La presente descripción también proporciona el uso de relaxina modificada para preparar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, en particular, los trastornos mencionados anteriormente.

La presente descripción también proporciona un método para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, en particular, los trastornos mencionados anteriormente, usando una cantidad efectiva de al menos una relaxina modificada de la descripcióNo.

La presente descripción también proporciona una

relaxina modificada para usar en un método para el tratamiento y/o la profilaxis de arteriopatía coronaria, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica o insuficiencia cardíaca avanzada) e infarto de miocardio.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en los métodos y las composiciones de la presente descripción incluyen composiciones que contienen los ingredientes activos en una cantidad efectiva para lograr la finalidad prevista, por ejemplo, tratar la insuficiencia cardíaca. Las personas de experiencia en la técnica pueden determinar una dosis efectiva en vista de la presente descripcióNo.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos *in vitro*, por ejemplo, activación del receptor RXFP1, *ex vivo* en corazones de rata aislados perfundidos, o en modelos de animales, generalmente ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. El modelo de animal también se usa para lograr un intervalo de concentración y una mediante de administración convenientes. Luego, se puede usar esa información para determinar las dosis y las mediantes de administración útiles en seres humanos.

Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la

cantidad de una relaxina modificada que alivia los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándares *in vitro* o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población) y LD50 (la dosis letal para 50 % de la población). La relación de dosis de los efectos terapéuticos con respecto a los efectos tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación ED50/LD50. Las composiciones farmacéuticas de ejemplo presentan índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* y estudios en animales se usan para formular un intervalo de dosis para usar en seres humanos. La dosis de tales compuestos se encuentra, por ejemplo, dentro de un intervalo de concentraciones circulatorias que incluyen la ED50 con toxicidad leve o nula. La dosis varía dentro de este intervalo en función de la forma de dosis utilizada, la sensibilidad del paciente y la mediante de administración.

Las cantidades de dosis normales pueden variar de 0.1 a 100.000 miligramos de dosis total, según la mediante de administración. En la literatura se proporciona orientación con respecto a las dosis particulares y los métodos de administración. Véanse las patentes estadounidenses Nos.

4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212.

XIII. Combinaciones

Una relaxina modificada de la descripción se puede administrar sola o en combinación con otros compuestos activos. En este contexto, el término "combinación" abarca cualquier medio de administración concurrente o secuencial, independientemente de que la relaxina modificada y el otro agente estén contenidos en la misma composición o se administren por separado, en donde la administración puede ser mediante la misma mediante de administración o mediantes de administración diferentes. La presente descripción proporciona medicamentos que comprenden al menos una relaxina modificada y uno o más ingredientes activos adicionales, en composiciones farmacéuticas en donde se mezcla con excipientes o portadores aceptables farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento y/o la prevención de los trastornos mencionados anteriormente.

Los ingredientes activos adecuados para la combinación pueden incluir, por ejemplo: ingredientes activos que modulan el metabolismo lipídico, antidiabéticos, agentes hipotensos, agentes mejoradores de la perfusión y/o agentes antitrombóticos, antioxidantes, antagonistas del receptor de quimiocina, inhibidores de la quinasa p38, agonistas de NPY, agonistas de orexina, anorexígenos, inhibidores de PAF-AH, antiflogísticos (inhibidores de COX, antagonistas del

receptor de LTB_4), analgésicos, por ejemplo, aspirina, inhibidores de P2Y12, tales como Clopidogrel, inhibidores de PCSK9, tales como evolocumab (REPATHA) o alirocumab (PRALUENT), antidepresivos y otros psicofarmacéuticos.

La presente descripción también proporciona combinaciones de al menos una relaxina modificada con al menos un ingrediente activo que altera el metabolismo lipídico, antidiabético, ingrediente activo reductor de la presión sanguínea y/o agente que tiene efectos antitrombóticos.

La relaxina modificada se puede combinar con uno o más ingredientes activos que modulan el metabolismo lipídico, por ejemplo, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la expresión de HMG-CoA reductasa, inhibidores de la síntesis de escualeno, inhibidores de ACAT, inductores del receptor de LDL, inhibidores de la absorción del colesterol, adsorbedores poliméricos de ácido biliar, inhibidores de la reabsorción de ácido biliar, inhibidores de MTP, inhibidores de lipasa, activadores de LpL, fibratos, niacina, agonistas del receptor de niacina, inhibidores de CETP, agonistas de PPAR-a, PPAR-γ y/o PPAR-δ, moduladores de RXR, moduladores de FXR, moduladores de LXR, hormonas tiroideas y/o miméticos tiroideos, inhibidores de ATP citrato liasa, antagonistas de Lp(a), antagonistas del receptor canabinoide 1, agonistas del

receptor de leptina, agonistas del receptor de bombesina, inhibidores de PCSK9, agonistas del receptor de histamina y los barredores antioxidantes/radicales.

En algunas modalidades, una relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de HMG-CoA reductasa de la clase de las estatinas, por ejemplo, lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina o pitavastatina. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de la síntesis de escualeno, por ejemplo, BMS-188494 o TAK-475. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de ACAT, por ejemplo, avasimibe, melinamide, pactimibe, eflucimibe o SMP-797. En otra modalidad, la otra relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de la absorción de colesterol, por ejemplo, ezetimibe, tiqueside o pamaqueside. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de MTP, por ejemplo, implitapide, BMS-201038, R-103757 o JTT-130. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de lipasa, por ejemplo, orlistat. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con una hormona tiroidea y/o un mimético tiroideo, por ejemplo, D-tiroxina o 3,5,3'-triiodotironina (T3). En otra modalidad, la relaxina

modificada se administra en combinación con un agonista del receptor de niacina, por ejemplo, niacina, acipimox, acifran o radecol. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de CETP, por ejemplo, dalcetrapib, BAY 60-5521, anacetrapib o vacuna contra CETP (CETi-1). En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un agonista de PPAR-γ, por ejemplo, de la clase de las tiazolidindionas, por ejemplo, pioglitazona o rosiglitazona. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un agonista de PPAR-δ, por ejemplo, GW-501516 o BAY 68-5042. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un adsorbedor polimérico de ácido biliar, por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesolvam, CholestaGel o colestimida. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de la reabsorción de ácido biliar, por ejemplo, inhibidores de ASBT (= IBAT), tales como AZD-7806, S-8921, AK-105, BARI-1741, SC-435 o SC-635. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un barredor antioxidante/radical, por ejemplo, probucol, AGI-1067, BO-653 o AEOL-10150. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista del receptor canabinoide 1, por ejemplo, rimonabant o SR-147778.

La relaxina modificada se puede combinar con uno o

más antidiabéticos, por ejemplo, insulina o derivados de insulina, sulfonilureas, biguanidas, derivados de meglitinida, inhibidores de glucosidasa, agonistas de PPAR-gamma, inhibidores de dipeptidil-peptidasa IV (inhibidores de DPP-IV), oxadiazolidinonas, tiazolidindionas, agonistas del receptor de GLP 1, antagonistas de glucagón, sensibilizadores de insulina, agonistas del receptor de CCK 1, agonistas del receptor de leptina, inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glicogenólisis, moduladores de la absorción de glucosa y también activadores del canal de potasio.

En algunas modalidades, la relaxina modificada se administra en combinación con insulina o un derivado de insulina. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con una sulfonilurea, por ejemplo, tolbutamida, glibenclamida, glimepirida, glipizida o gliclazida. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con una biguanida, por ejemplo, metformina. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un derivado de meglitinida, por ejemplo, repaglinida o nateglinida. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de glucosidasa, por ejemplo, miglitol o acarbosa. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de DPP-IV, por ejemplo,

sitagliptin y vildagliptiNo. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un agonista de PPAR-gamma, por ejemplo, de la clase de las tiazolindionas, por ejemplo, pioglitazona o rosiglitazona.

La relaxina modificada se puede combinar con uno o más ingredientes activos hipotensos, por ejemplo, antagonistas de calcio, antagonistas de angiotensina II, inhibidores de ACE, inhibidores de renina, bloqueadores del receptor beta, bloqueadores del receptor alfa, diuréticos, antagonistas de aldosterona, antagonistas del receptor mineralocorticoide, inhibidores de ECE, inhibidores de ACE/NEP y los inhibidores de vasopeptidasa.

En algunas modalidades, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista de calcio, por ejemplo, nifedipine, amlodipine, verapamil o diltiazem. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista de la angiotensina II, por ejemplo, losartan, valsartan, candesartan, embusartan, olmesartan o telmisartaNo. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de ACE, por ejemplo, enalapril, captopril, lisinopril, ramipril, delapril, fosinopril, quinopril, perindopril o trandopril. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un bloqueador del receptor beta, por ejemplo, propranolol, atenolol, timolol, pindolol, alprenolol,

oxprenolol, penbutolol, bupranolol, metipranolol, nadolol, mepindolol, carazalol, sotalol, metoprolol, betaxolol, celiprolol, bisoprolol, carteolol, esmolol, labetalol, carvedilol, adaprolol, landiolol, nebivolol, epanolol o bucindolol. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un bloqueador del receptor alfa, por ejemplo, prazosina. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un diurético, por ejemplo, furosemida, bumetanida, torsemida, bendroflumetiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, politiazida, triclorometiazida, clorotalidona, indapamida, metolazona, quinetazona, acetazolamida, diclorofenamida, metazolamida, glicerol, isosorbida, manitol, amilorida o triamtereno. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista de aldosterona o del receptor mineralocorticoide, por ejemplo, espironolactona o eplerenona. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista del receptor de vasopresina, por ejemplo, conivaptan, tolvaptan, lixivaptan o SR-121463.

La relaxina modificada se puede combinar con uno o más de los siguientes: agentes antitromboembóticos, por ejemplo, inhibidores de la agregación de plaquetas o los anticoagulantes; diuréticos; antagonistas del receptor de

vasopresina; nitratos orgánicos y donantes de NO; compuestos con actividad inotrópica positiva; compuestos que inhiben la degradación del monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) y/o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), tal como inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) 1, 2, 3, 4 y/o 5, en particular, inhibidores de PDE 5, tales como sildenafil, vardenafil y tadalafil, y también inhibidores de PDE 3, tales como milrinona; péptidos natriuréticos, por ejemplo, "péptido natriurético auricular" (ANP, anaritida), "péptido natriurético tipo B" o "péptido natriurético cerebral" (BNP, nesiritida), "péptido natriurético tipo C" (CNP) y también urodilatina; agonistas del receptor de prostaciclina (receptor IP), por ejemplo, iloprost, beraprost, cicaprost; inhibidores del canal de If (canal "funny"), por ejemplo, ivabradine; sensibilizadores de calcio, tales como levosimendan; suplementos de potasio; estimuladores de guanilato ciclasa independiente de NO pero dependientes de heme, por ejemplo, los compuestos descritos en WO 00/06568, WO 00/06569, WO 02/42301 y WO 03/095451; activadores de guanilato ciclasa independientes de NO y heme, por ejemplo, los compuestos descritos en WO 01/19355, WO 01/19776, WO 01/19778, WO 01/19780. WO 02/070462 y WO 02/070510; inhibidores de elastasa de neutrófilo humana (HNE), por ejemplo, sivelestat y DX-890 (Reltran); compuestos que inhiben la cascada de transducción de señal, por ejemplo,

inhibidores de tirosina quinasa, por ejemplo, sorafenib, imatinib, gefitinib y erlotinib; y/o compuestos que modulan el metabolismo energético del corazón, por ejemplo, etomoxir, dicloroacetato, ranolazina y trimetazidina.

En algunas modalidades, la relaxina modificada se administra en combinación con un nitrato orgánico o donante de NO, por ejemplo, nitroprusiato, nitroglicerol, mononitrato de isosorbida, dinitrato de isosorbida, molsidomina o SIN-1, o en combinación con NO inhalable. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un compuesto inotrópico positivo, por ejemplo, glucósidos cardíacos (digoxina), agonistas beta-adrenérgicos y dopaminérgicos, tales como isoproterenol, adrenalina, noradrenalina, dopamina o dobutamina. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con antisimpatotónicos, tales como reserpina, clonidina o alfa-metildopa, o en combinación con agonistas del canal de potasio, tales como minoxidil, diazóxido, dihidralazina o hidralazina, o con sustancias que liberan óxido de nitrógeno, tales como nitrato de glicerol o nitroprusiato. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de la agregación de plaquetas, por ejemplo, aspirina, clopidogrel, ticlopidina o dipiridamol. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor de trombina, por

ejemplo, ximelagatran, melagatran, dabigatran, bivalirudin o clexano. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista de GPIIb/IIIa, por ejemplo, tirofiban o abciximab. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un inhibidor del factor Xa, por ejemplo, rivaroxaban (BAY 59-7939), DU-176b, apixaban, otamixaban, fidexaban, razaxaban, fondaparinux, idraparinux, PMD-3112, YM-150. KFA-1982, EMD-503982, MCM-17, MLN-1021, DX 9065a, DPC 906, JTV 803, SSR-126512 o SSR-128428. En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con heparina o un derivado de heparina de bajo peso molecular (LMW). En otra modalidad, la relaxina modificada se administra en combinación con un antagonista de la vitamina K, tal como Coumadin (warfarina).

La presente descripción también proporciona medicamentos que comprenden al menos una relaxina modificada, usualmente junto con uno o más auxiliares inertes no tóxicos adecuados farmacéuticamente aceptable, y también su uso para los fines mencionados anteriormente. Opcionalmente, tal medicamento puede comprender la relaxina modificada y otro ingrediente activo, tal como los que se identificaron anteriormente. Por ejemplo, el medicamento puede comprender la relaxina modificada y otro ingrediente activo en una cantidad efectiva para el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca y/o una

enfermedad asociada a la fibrosis.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Incorporación ribosómica de un aminoácido codificado de manera no natural en preprorrelaxina

Este ejemplo ilustra la clonación y expresión de un polipéptido de relaxina, lo que incluye un aminoácido codificado de manera no natural en *E. coli*.

Los métodos para clonar relaxina son conocidos por las personas de experiencia en la técnica. Las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos para la relaxina y clonación de relaxina en las células hospedera se detallan en la patente estadounidense No. 4,758,516; patente estadounidense No. 5,166,191; patente estadounidense No. 5,179,195, 5,945,402; y 5,759,807; las cuales se incorporan a la presente por referencia.

El cADN que codifica relaxina se muestra como SEQ ID NO: 12 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se muestra como SEQ ID NO: 1. Las secuencias de relaxina de ejemplo se proporcionan en la Tabla 1.

TABLA 1: Secuencias de relaxina

SEQ ID NO:	**Nombre de la secuencia**	**Secuencia**
1	Secuencia de aminoácidos de	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

	relaxina (cadenas A y B)	
2	Secuencia de aminoácidos de relaxina Ala B1 (cadenas A y B)	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
3	Secuencia de aminoácidos de prorrelaxina de ejemplo	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLQVGQV ELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKR SLARFC
4	Secuencia de aminoácidos de la cadena A de relaxina	QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
5	Secuencia de aminoácidos de la cadena B de relaxina	DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
6	Secuencia de aminoácidos con Ala B1 de la cadena B de relaxina	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
7	Secuencia de aminoácidos de péptido C (péptido conector) de ejemplo	RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
8	Secuencia líder de aminoácidos de relaxina de ejemplo	MKKNIAFLLKR
9	Secuencia líder de aminoácidos de	MIEGGR

	insulina de ejemplo	
10	Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena A de relaxina de ejemplo	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttgg ttgtaccaaaagatctcttgctagattttgc
11	Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena A de relaxina de ejemplo	gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcga attagttcgcgcgcagattgccatttgcggcatgagcacct ggagc
12	Secuencia de ácidos nucleicos de las cadenas A y B de relaxina de ejemplo	caactctacagtgcattggctaataaatgttgccatgttgg ttgtaccaaaagatctcttgctagattttgc gactcatggatggaggaagttattaaattatgcggccgcga attagttcgcgcgcagattgccatttgcggcatgagcacct ggagc
13	Secuencia líder de ácidos nucleicos de relaxina de ejemplo	atgaaaaagaatatcgcatttcttcttaaacgg
14	Secuencia líder de ácidos nucleicos de insulina de ejemplo	atgattgaaggtggtcgt
15	Ejemplo de una secuencia de aminoácidos del constructo de expresión de relaxina	MIEGGRDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAED LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCH VGCTKRSLARFC
35	Cadena A de relaxina sustituida con para-acetil-L-	(pAcF)LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

	fenilalanina en la posición 1	
36	Cadena A de relaxina sustituida con asparagina en la posición 1	NLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
37	Cadena B de relaxina sustituida con para-acetil fenilalanina en la posición 25	ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG(pAcF)STWS
38	Secuencia de expresión de preprorrelaxina de ejemplo (X puede ser, por ejemplo, pAcF)	MIEEGR ASWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS RREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQGR XLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
39	Secuencia líder de aminoácidos de insulina de ejemplo	MIEEGR

Un sistema de traducción introducido que comprende tARN ortogonal (O-tARN) y una aminoacil-tARN sintetasa ortogonal (O-RS) se usa para expresar relaxina o análogos de relaxina que contienen un aminoácido codificado de manera no natural. La O-RS aminoacila, preferentemente, el O-tARN con un aminoácido codificado de manera no natural. A su vez, el sistema de traducción inserta el aminoácido codificado de manera no natural en la relaxina o el análogo de relaxina, en

respuesta a un codón selector codificado. Las secuencias de O-RS y O-tARN adecuadas se describen en WO 2006/068802, con el título "Composiciones de aminoacil-tARN sintetasa y sus usos" (E9; SEQ ID NO: 16) y en WO 2007/021297, con el título "Composiciones de tARN y sus usos" (F13; SEQ ID NO: 17), que se incorporan por referencia en su totalidad a la presente. Las secuencias de ejemplo que se pueden usar se ilustran en la Tabla 2.

TABLA 2: Secuencias usadas en los sistemas de expresión

SEQ ID NO:18	*M. jannaschii* $\mathrm{mtRNA}^{\mathrm{Tyr}}_{\mathrm{CUA}}$	tARN
SEQ ID NO:19	*HLAD03; un tARN supresor ámbar optimizado*	tARN
SEQ ID NO:20	*HL325A; un tARN supresor del desplazamiento del marco de lectura AGGA optimizado*	tARN
SEQ ID NO:21	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina p-Az-PheRS(6)*	RS
SEQ ID NO:22	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina p-BpaRS(1)*	RS
SEQ ID NO:23	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS*	RS
SEQ ID NO:24	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS*	RS

SEQ ID NO:25	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina Propargil-PheRS*	RS
SEQ ID NO:26	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(1)*	RS
SEQ ID NO:27	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(3)*	RS
SEQ ID NO:28	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(4)*	RS
SEQ ID NO:29	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina p-Az-PheRS(2)*	RS
SEQ ID NO:30	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW1)*	RS
SEQ ID NO:31	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil -fenilalanina (LW5)*	RS
SEQ ID NO:32	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina (LW6)*	RS
SEQ ID NO:33	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-5)*	RS
SEQ ID NO:34	*Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina (AzPheRS-6)*	RS

La transformación de *E. coli* con plásmidos que contienen el gen de relaxina modificada o análogos de relaxina y el par tARN/aminoacil tARN sintetasa ortogonal

(específico para el aminoácido codificado de manera no natural deseado) permite la incorporación específica de sitio del aminoácido codificado de manera no natural en el polipéptido de relaxina, como se describe en la patente estadounidense No. 8,735,539, la cual se incorpora a la presente en su totalidad.

La relaxina madura de tipo silvestre se amplifica mediante PCR de una reacción de síntesis de cADN con el uso de protocolos y se clona en un vector de plásmido, tal como pET30 (NcoI-BamHI). La secuencia de relaxina se subclonó en un vector de supresión que contiene un supresor ámbar tirosil tARNTyr/CUA de *Methanococcus jannaschii* (Mj tRNATyr/CUA) bajo control consecutivo de un promotor de síntesis derivado de la secuencia promotora de lipoproteína de *E. coli* (Miller, J.H., Gene, 1986), así como la tirosil-tARN-sintetasa ortogonal (MjTyrRS) (por ejemplo, E9) bajo control del promotor GlnRS de *E. coli*. La expresión de relaxina estaba controlada por el promotor T7, el cual estaba indirectamente inducido por L-arabinosa. Las mutaciones ámbar se introdujeron usando protocolos estándares de mutación de cambios rápidos (Stratagene; La Jolla, California). Se verificaron las secuencias de los constructos.

Supresión con para-acetil-fenilalanina (pAcF)

Los plásmidos que contienen el gen de relaxina modificada que comprende una mutación ámbar (que codifica SEQ

ID NO: 38 con pAcF en el residuo 1 de la cadena A, véase la Figura 4) y el par tARN/aminoacil tARN sintetasa ortogonal, como se describió anteriormente, se usaron para transformar en la cepa W3110B55 de *Escherichia coli* [F- IN (*rrn*D-*rrn*E) lambda*araB*::*g*1 *tet*A *fhu*A::*dhfr proS* W375R*::cat*] para producir cepas de *E. coli* en donde la expresión de la polimerasa T7 estaba controlada por un promotor inducible por arabinosa. Los cultivos bacterianos se diluyeron 1:100 durante la noche en matraces de agitación que contenían medio de cultivo 2X YT y se cultivaron a 37 °C a una OD_{600} de ~ 0.8. La expresión proteica se indujo mediante la adición de arabinosa (0.2 % final) y para-acetil-fenilalanina (pAcF) hasta proporcionar una concentración final de 4 mM. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 5 horas. Las células se convirtieron en pelets y se volvieron a suspender en amortiguador de lisis B-PER (Pierce), 100ul/OD/ml + 10ug/ml de Dnasa, y se pueden incubar a 37 °C durante 30 miNo. El material celular se retiró mediante centrifugación, y el sobrenadante se retiró. El pelet se volvió a suspender en una cantidad igual de amortiguador de carga de proteínas SDS-PAGE. Todas las muestras se cargaron en un gel de PAGE al 4-12 % con MES y DTT. La expresión de relaxina se confirmó mediante SDS-PAGE, análisis de transferencia Western o espectrometría de masa de trampa de iones por ionización de electrorrocío, y similares.

La secuencia génica de relaxina modificada puede

incluir una etiqueta His del N-terminal, por ejemplo, HHHHHHSGG (SEQ ID NO: 55). Las proteínas de relaxina mutantes etiquetadas con His se pueden purificar usando métodos conocidos por las personas de experiencia en la técnica. La resina quelante de níquel ProBond (Invitrogen, Carlsbad, CA) se puede usar mediante los procedimientos estándares de purificación de proteínas etiquetadas con His proporcionados por el fabricante. Las mediciones funcionales de las proteínas se pueden realizar a través de métodos conocidos en el estado de la técnica, métodos proporcionados en la presente solicitud y referencias incluidas, y, de manera alternativa, se puede desarrollar un ELISA en células vivas para evaluar los polipéptidos de relaxina de la invenciónNo.

Ejemplo 2: Producción y purificación de relaxina madura que contiene un aminoácido codificado de manera no natural

La preprorrelaxina (SEQ ID NO: 38 con pAcF en el residuo 1 de la cadena A, véase la Figura 4) se produjo mediante fermentación en células *E. coli* como cuerpos de inclusióNo. El aminoácido codificado de manera no natural para-acetil-fenilalanina se incorporó ribosómicamente mediante los métodos generales proporcionados en el Ejemplo 1.

Las células de *E. coli* que contenían el plásmido que expresaba un polipéptido de relaxina modificada se

cultivaron en un fermentador que contenía medio de fermentaciónNo. Se agregó kanamicina al fermentador para promover la estabilidad del plásmido. Se agregó L-alanina-L-para-acetilfenilalanina clorhidrato (L-Ala-*p*AcF) al fermentador para permitir la incorporación de p-acetilfenilalanina (*p*AcF) en la secuencia de aminoácidos de preprorrelaxina. Finalmente, se agregó L-arabinosa para inducir la expresión de preprorrelaxina. La preprorrelaxina producida en el interior de las células produjo la formación de cuerpos de inclusión insolubles (IB). El caldo de fermentación se cultivó después de una duración posterior a la inducciónNo. El título de fermentación era aproximadamente 4,5 g de preprorrelaxina por litro de fermentaciónNo.

Los cuerpos de inclusión (IB) se separaron de las células intactas por lisado de células en alto cizallamiento. Los IB intactos se recuperaron mediante centrifugaciónNo. Luego de la recuperación, los pelets de IB se volvieron a suspender en agua y se volvieron a centrifugar para eliminar las impurezas. Los IB lavados se solubilizaron a pH 8.5 en un amortiguador de guanidina/Tris 5M que contenía 5 mM de ditiotreitol (DTT). El replegamiento de la preprorrelaxina se obtuvo mediante dilución lenta de la solución de IB solubilizados aproximadamente 4.5 veces en un amortiguador de Tris a pH 8.5 enfriado que contenía 5 mM de DTT y 8.5 mM de cistamina. La solución de replegamiento se incubó durante un

mínimo de 12 h antes de continuar con el procesamiento. Una vez completado el período de incubación, el pH se bajó a 3.5-4.0 mediante adición de ácido acético y ácido clorhídrico, para promover la precipitación de impurezas. El material precipitado se retiró mediante centrifugación y luego filtración en profundidad.

La solución de replegamiento filtrada en profundidad se diluyó aproximadamente 6.5 veces con amortiguador de acetato a pH 4 para reducir la conductividad en la preparación para la carga en una columna de intercambio catiónico Tosoh Bioscience SP550C. Luego de la carga, la columna SP550C se lavó, y luego la preprorrelaxina se eluyó con un gradiente de 10 % - 90 % de 50 mM de amortiguador de acetato a pH 5.5 que contenía NaCl 1 M. El eluato de SP550C se diluyó con agua purificada hasta que la concentración de preprorrelaxina fue de 1,5 mg/ml. El pH se ajustó a 8,0 mediante adición de Tris 2 M, pH 8.0. luego se agregaron 2 mM de CaCl2 en la preparación para la conversión enzimática.

La tripsina de tipo silvestre se modificó con anhídrido succínico (es decir, succinilación) para facilitar la supresión de la mezcla de reacción de preprorrelaxina/tripsina al completarse la etapa de tratamiento de tripsina. La tripsina de tipo silvestre se concentró en 10 mM de HCl, 20 mM de CaCl2 se diluyeron en 5 mg/ml con agua purificada, luego se agregó amortiguador de

borato 1 M a pH 7.6 para proporcionar una concentración final de 0.2 M. Se agregó anhídrido succínico sólido a la solución de tripsina diluida con pH ajustado en un exceso molar de 100 con respecto a tripsina en tres adiciones equimolares (adiciones de exceso molar 3 x 33.3) mezclando durante 10 minutos entre cada adicióNo.

Se agregó tripsina succinilada a la solución de preprorrelaxina incubada a 22 °C durante 4 horas para asegurar la supresión enzimática completa del péptido conector y la secuencia líder de la molécula de preprorrelaxina. La molécula relaxina-R resultante contiene una arginina de C-terminal en la cadena B. El material tratado con tripsina luego se procesó a través de un filtro de intercambio aniónico Sartobind STIC® PA que une la tripsina succinilada mientras se recolectó la relaxina-R en el flujo continuo. Se agregó carboxipeptidasa-B (CPB) al filtrado STIC® PA incubado con agitación durante 2 horas para asegurar la supresión enzimática completa del residuo de arginina del C-terminal de la cadena B. La reacción de CPB se inactivó bajando el nivel del pH de la mezcla de reacción a 2.8 - 3.2.

La relaxina madura se purificó usando la resina de intercambio catiónico Tosoh Bioscience SP-5PW. La relaxina madura se cargó en la columna, y luego la columna se lavó tres veces; 1) 50 mM de acetato, pH 5.5, 2) 50 mM de acetato,

pH 5.5, NaCl 0.1 M y 3) 50 mM de acetato, pH 4.0. La relaxina unida se eluyó a pH 4 usando un gradiente lineal de 0 % a 100 % de KCl 2 M en 20 volúmenes de columna. El pH de la de relaxina eluida se ajustó a 3.0 usando HCl 1 M antes de continuar con el procesamiento. De manera alternativa, la tripsina se retiró de la mezcla de reacción mediante precipitacióNo. La relaxina se precipitó después de aumentar el pH de la mezcla de reacción a 8.0 durante 1 hora a temperatura ambiente. La relaxina precipitada luego se recuperó mediante centrifugacióNo. El pelet se lavó 3 veces mediante resuspensión del pelet en amortiguador de Tris a pH 8 y luego centrifugacióNo. Después del lavado final, el pelet se volvió a solubilizar en 20 mM de ácido acético. La relaxina purificada no mostró actividad tríptica. El producto final fue relaxina madura.

Se usó esencialmente el mismo método de síntesis para producir RLX-AQ1 (“AQ1”) (Figura 2) y RLX-BM25/AN1 (“BM25/AN1”) (Figura 3), con la modificación adecuada de la secuencia de preprorrelaxina.

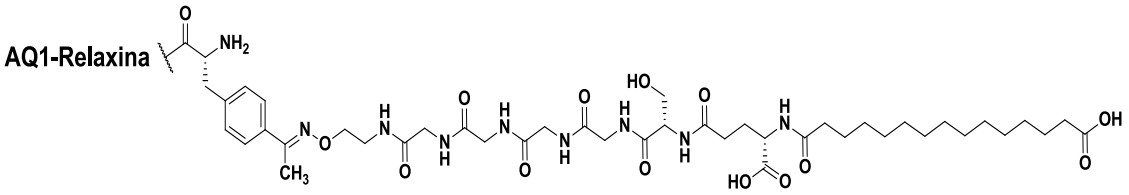
Ejemplo 3: Conjugación de relaxina con el mejorador PK que comprende un péptido ligado a un ácido graso

La relaxina purificada se concentró mediante ultrafiltración a aproximadamente 10 mg/ml. El mejorador PK activado por aminooxi que comprende un péptido y un ácido graso C15 (por ejemplo, GGGGS-Glu^{Y}

(SEQ ID NO: 139)-C14-COOH) se agregó a la mezcla de reacción en un exceso molar de 1,5 con respecto a relaxina. Un aditivo de hidrazida (es decir, 4 amino-benzoico hidrazida) luego se agregó en un exceso molar de 45 con respecto a relaxina. La solución se ajustó según era necesario con HCl 1 M para mantener un pH de 3.5 a 4.0. y la temperatura se controló a 30 °C. La reacción de conjugación formó un enlace oxima estable entre el ligador peptídico ligado a un ácido graso C15 (por ejemplo, GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH), que se preparó de conformidad con el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, y el residuo de para-acetil-fenilalanina en la relaxina. La reacción se completó dentro de las 16 horas.

La mezcla de reacción de conjugación se diluyó hasta ≤ 4 mS/cm con 10 mM de amortiguador de acetato a pH 4.0. luego se cargó en una columna de intercambio catiónico GE Healthcare SP HP. Una vez que la carga se completó, la columna se lavó con 20 mM de histidina a pH 6,0 para eliminar las impurezas. El conjugado relaxina-C15 (que comprende, por ejemplo, AQ1-relaxina-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH) luego se eluyó con 50 mM de bicarbonato de amonio, pH 8,5. La estructura de la relaxina madura se ilustra esquemáticamente en la Figura 5 y en la

Fórmula III:



(Fórmula III).

El conjugado de relaxina purificada-C15 se concentró y luego se diafiltró en un amortiguador de formulación final adecuado. Un ejemplo de composición del conjugado es 8 mg/ml de conjugado de relaxina-C15 en 20 mM de histidina, sacarosa 0.25 M, 0.05 % (p/v) de polisorbato-80. pH 5,5. La composición se almacenó congelada a ≤ -60 °C.

Otros conjugados de relaxina-ácido graso se pueden preparar usando procesos similares.

Ejemplo 4: Síntesis de mejoradores PK en fase sólida

Los mejoradores PK descritos en la presente se pueden preparar usando los procedimientos que se ejemplifican más adelante.

Las abreviaturas que se usan en la presente solicitud, que incluyen, en particular, los siguientes esquemas y ejemplos ilustrativos, son conocidas por las personas de experiencia en la técnica. Algunas de las abreviaturas que se usan son las siguientes: min para minutos; h para horas; rt para temperatura ambiente; sat.

para saturado; TFA para ácido trifluoroacético; DMF para N,N-dimetilformamida; DCM para diclorometano; Fmoc para 9-fluorenilmetiloxicarbonilo; HATU = hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido; DIEA o DIPEA para diisopropiletilamina; NMP para N-metilpirrolidona; EDC para 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; DMSO para dimetilsulfóxido; MeOH para metanol; EtOAc para acetato de etilo; Et_3N para trietilamina; MeCN o ACN para acetonitrilo.

Datos analíticos: Espectrometría de masa: "ESI-MS(+)" significa ionización por electrorrocío-espectrometría de masa realizadas en modo de ion positivo; "ESI-MS(-)" significa ionización por electrorrocío-espectrometría de masa realizadas en modo de ion negativo; "ESI-HRMS(+)" significa ionización por electrorrocío-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ion positivo; "ESI-HRMS(-)" significa ionización por electrorrocío-espectrometría de masa de alto rendimiento realizadas en modo de ion negativo. Las masas detectadas se informan de conformidad con la designación de unidad "*m/z*". En general, los compuestos con masas exactas mayores de 1000 se detectaron como iones de doble carga, de triple carga o de cuádruple carga. CAD: Detector de aerosol cargado. ELSD: Detector de dispersión de luz evaporativa.

Condición A del análisis de LCMS: Columna: Waters

Acuity UHPLC BEH C18, 2.1 × 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 0.05% de TFA; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 0.05% de TFA; temperatura: 50 °C; gradiente: 0-100% de B durante 3 min, luego un mantenimiento de 1.0 minutos a 100% de B; flujo: 1 ml/min; detección: masa.

Condición B del análisis de LCMS: Columna: Waters Acuity UHPLC BEH C18, 2.1 × 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50 °C; gradiente: 0-100 % de B durante 3 min, luego un mantenimiento de 1.0 minutos a 100 % de B; flujo: 1.0 ml/min; detección: masa.

Condición A del análisis de UHPLC-CAD: Columna: Waters BEH Phenyl, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA, fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 35 % de B de 0 min a 15 min, 35 % de B a 95 % de B de 16 min a 25 min, luego un mantenimiento de 1.0 min a 95 % de B; tiempo posterior a la corrida: 4 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 3 µl de muestra de 2 mg/ml en DMSO; detección: CAD en un intervalo de 100 PA y gas a 35 psi (2.46 kgf/cm^2).

Condición B del análisis de UHPLC-CAD: Columna:

Waters BEH Phenyl, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA, fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 95 % de B de 0 min a 25 min, luego un mantenimiento de 1.0 min a 95 % de B; tiempo posterior a la corrida: 4 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 3 µl de muestra de 2 mg/ml en DMSO; detección: CAD en un intervalo de 100 PA y gas a 34 psi (2.39 kgf/cm^2).

Procedimientos generales:

Todas las manipulaciones se realizaron mediante automatización en un sintetizador de péptidos Prelude (Protein Technologies). A menos que se indique lo contrario, todos los procedimientos se realizaron en un recipiente de reacción de polipropileno de 40 ml equipado con una frita en la parte inferior. El recipiente se conecta al sintetizador de péptidos Prelude a través de la parte inferior y superior del recipiente. Se puede agregar DMF a través de la parte superior e inferior del recipiente, lo que produce el lavado parejo de los laterales del recipiente. Los reactivos se agregan únicamente a través de la parte inferior del recipiente y se hacen pasar a través de la frita para entrar en contacto con la resina. Todas las soluciones se retiraron a través de la parte inferior del recipiente. La "agitación periódica" describe un impulso breve de gas de N_2 a través de

la frita de la parte inferior; el impulso dura aproximadamente 5 segundos y se produce cada 30 segundos. En general, no se usaron soluciones de aminoácidos de más de dos semanas desde de la preparacióNo. Se usaron soluciones HATU dentro de las dos semanas de preparacióNo. DMF = dimetilformamida; HATU = hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium 3-óxido; DIPEA = diisopropiletilamina; resina de cloruro de 2-clorotritilo = resina de cloruro de 2-clorotrifenilmetilo (Chem-Imprex, malla 100 – 200. microesferas amarillas, 1.1 meg/g). Los aminoácidos comunes usados se enumeran a continuación con grupos protectores de cadenas laterales que se indican entre paréntesis. Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Thr(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(^{t}Bu)-OH; Fmoc-Val-OH. Los siguientes derivados de ácidos grasos se utilizaron para la última etapa de acoplamiento, $HO_2C(CH_2)_nCH_3$, n = 10 – 18 y $HO_2C(CH_2)_n(CO_2{}^tBu)$, n = 10 – 18.

El procedimiento general describe un experimento realizado en una escala de 0.4 mmol, en donde la escala se

determinó mediante la cantidad de (9H-fluoren-9-il)metil (2-(aminooxi)etil)carbamato unido a la resina. Esta escala corresponde aproximadamente a 364 mg de la resina descrita anteriormente. Sin embargo, se usaron 800 mg de la resina ya que se previó una eficacia de carga de 46 %. El exceso de cloruro de 2-clorotrifenilmetilo se inactivó con metanol al final de la reacción de carga. Todos los procedimientos se pueden realizar a una escala menor de una escala de 0.400 mmol ajustando los volúmenes descritos por el múltiplo de la escala. Antes del acoplamiento de los aminoácidos, todas las secuencias de síntesis de péptidos comenzaron con un procedimiento de carga del ligador y un procedimiento de expansión de resina, descrito a continuación como "procedimiento de carga del ligador" y "procedimiento de expansión de resina". Luego, en el acoplamiento de los aminoácidos al N-terminal de la amina primaria, se usó el "procedimiento de acoplamiento a la amina primaria" descrito a continuacióNo. En el acoplamiento de los aminoácidos al N-terminal de la amina secundaria, se usó el "procedimiento de acoplamiento secundario" descrito a continuacióNo. En la desprotección global y escisión de las resinas se usó el "procedimiento de desprotección global" descrito a continuacióNo. Por último, en la preparación de solución transparente que contiene productos crudos para la purificación mediante LC-MS se usó el "procedimiento de

preparación de muestra" descrito a continuacióNo.

Procedimiento de carga del ligador: Se usó la escala de 0.4 mmol para preparar seis recipientes de reacción (RV) con una carga de 0.4 mmol de (9H-fluoren-9-il)metil (2-(aminooxi)etil)carbamato para las resinas en cada RV. Se agregó DIEA (2.95 ml, 16.9 mmol) a una mezcla de (9H-fluoren-9-il)metil (2-(aminooxi)etil)carbamato clorhidrato (compuesto **4**, 0.803 g, 2.4 mmol) en CH_2Cl_2 (72 ml) a 0 °C. Inmediatamente después de que se volvió homogénea, 12 ml de esta solución transparente se agregaron a un vial de 30 ml que contenía 800 mg de resina de cloruro de 2-clorotritilo. Los 6 viales se colocaron en un agitador durante 75 min a 750 rpm. Luego, se agregaron 0.2 ml de MeOH a un vial por vez, cada uno de los cuales se agitó durante 2 min a 750 rpm. Las resinas se transfirieron a un RV de 40 ml, se lavaron con CH_2Cl_2 (8 ml × 3), DMF (8 ml × 3), CH_2Cl_2 (10 ml × 3). Este proceso (inactivación con MeOH y lavados con CH_2Cl_2/DMF/CH_2Cl_2) se aplicó a los otros 5 viales para proporcionar el compuesto ligador **5** unido a la resina en seis RV.

Procedimiento de expansión de resina: Los RV que contenían las resinas de la etapa anterior se conectaron con el sintetizador de péptidos Prelude, y las resinas se lavaron (se expandieron) tres veces de la siguiente manera: al RV se agregó DMF (10 ml), después de lo cual la mezcla se agitó periódicamente durante 10 min, luego el solvente se drenó a

través de la frita.

Procedimiento de acoplamiento a la amina primaria:

Al RV que contenía la resina de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 10.0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 5 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. A la RV se volvió a agregar piperidina:DMF (20:80 v/v, 10.0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 5 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó desde la parte inferior una vez de la siguiente manera: se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte inferior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. Al RV se agregó un aminoácido o un ácido graso (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq), HATU (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq) y DIPEA (0.8 M en DMF, 2.0 ml, 4 eq) en ese ordeNo. La mezcla se agitó periódicamente durante 15 min o 30 min, luego la mezcla de reacción se drenó a través de la frita (el tiempo de reacción de 15 min se usó solo para la primera reacción de acoplamiento para formar el primer

enlace amida en el sintetizador Prelude; para todas las otras secuencias, se aplicó el tiempo de reacción de 30 min). La resina se lavó sucesivamente tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (8,0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. Al RV se agregó DMF (3.3 ml), DIPEA (0.8 M en DMF, 1.5 ml, 3 eq). Una vez que la mezcla se agitó durante 30 segundos, se agregó anhídrido acético (1.0 M en DMF, 5.0 ml, 12.5 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 min, luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó desde la parte inferior una vez de la siguiente manera: se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte inferior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de acoplamiento a la amina secundaria:

Al RV que contenía las resinas de la etapa previa, se agregó piperidina:DMF (20:80 v/v, 10.0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 5 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. Al RV se volvió a agregar piperidina:DMF (20:80 v/v, 10.0 ml). La mezcla se agitó periódicamente durante 5 minutos, y luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó desde la parte inferior una vez de la siguiente manera: se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte inferior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción se agregó un aminoácido o un ácido graso (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq), HATU (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq) y DIPEA (0.8 M en DMF, 2.0 ml, 4 eq) en ese ordeNo. La mezcla se agitó periódicamente durante 30 min, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (8,0 ml) a

través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. Al recipiente de reacción se volvió a agregar un aminoácido o un ácido graso (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq), HATU (0.2 M en DMF, 4.0 ml, 2 eq) y DIPEA (0.8 M en DMF, 2.0 ml, 4 eq) en ese ordeNo. La mezcla se agitó periódicamente durante 30 min, luego la solución de reacción se drenó a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior tres veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (8.0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. Al RV se agregó DMF (3.3 ml), DIPEA (0.8 M en DMF, 1.5 ml, 3 eq). Una vez que la mezcla se agitó durante 30 segundos, se agregó anhídrido acético (1.0 M en DMF, 5.0 ml, 12.5 eq). La mezcla se agitó periódicamente durante 10 min, luego la solución drenó a través de la frita. La resina se lavó desde la parte inferior una vez de la siguiente manera: se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte inferior del recipiente, y la mezcla resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina se lavó sucesivamente desde la parte superior cuatro veces de la siguiente manera: para cada lavado, se agregó DMF (10.0 ml) a través de la parte superior del recipiente, y la mezcla

resultante se agitó periódicamente durante 2 min antes de que la solución se drenara a través de la frita. La resina resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

Procedimiento de desprotección global:

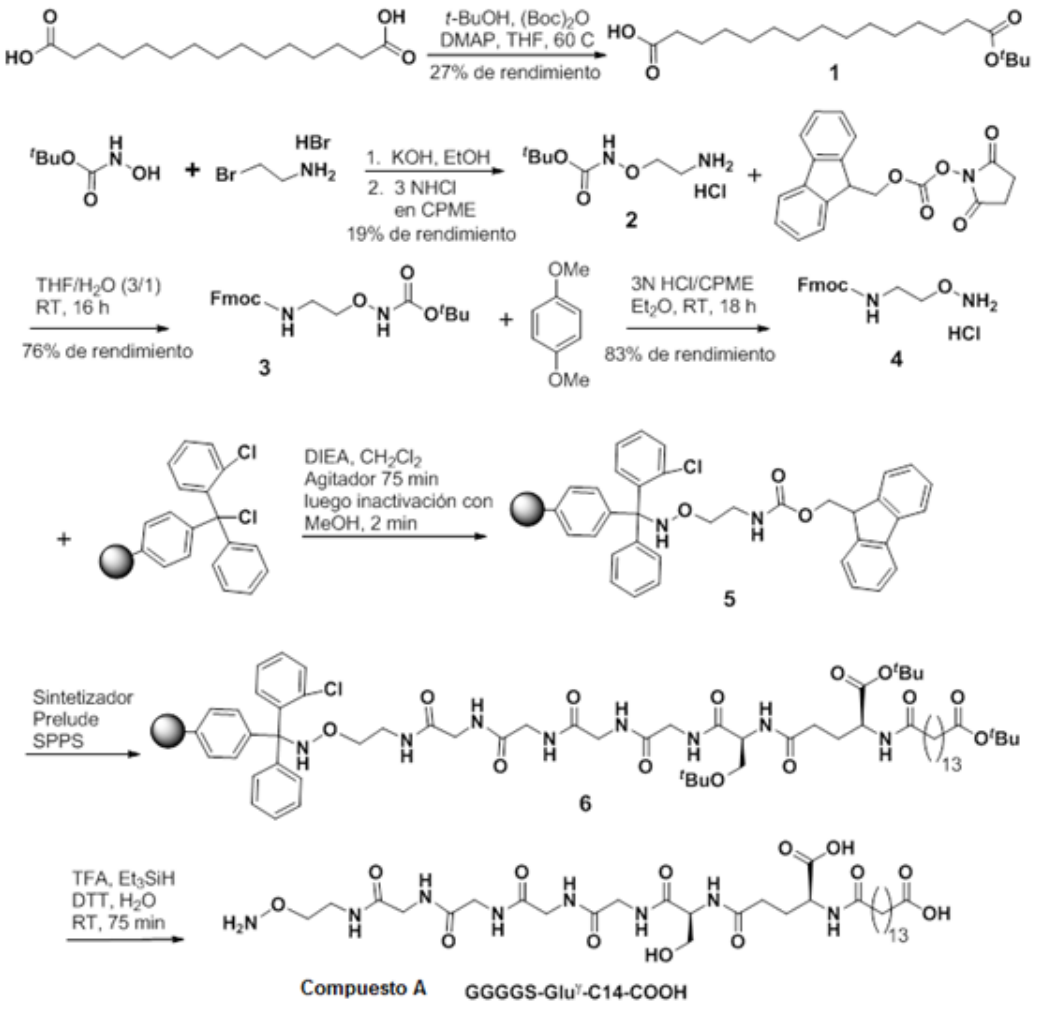
Una vez que terminó el procedimiento en el Prelude, cada RV se lavó con CH_2Cl_2 (8 ml × 6) y se secó al aire. Una vez que la resina fluía libremente, se transfirió a un vial de 30 ml, y se agregaron 8 ml de la solución de escisión (véase más adelante). Una vez que el vial se agitó en un agitador durante 75 min a 750 rpm, la mezcla de reacción se filtró. La solución transparente de color tostado se dividió en cuatro tubos de ensayo de 25 ml, cada uno de los cuales contenía 16 ml de dietiléter, lo que produjo la formación de suspensiones blancas. Cada una se centrifugó, se lavó dos veces con dietiléter para formar sólidos blancos en cada uno de los tubos de ensayo. La solución de escisión (50 ml) se preparó de la siguiente manera: a un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, se agregaron 500 mg de ditiotreitol, 46 ml de TFA, 2.5 ml de agua y 1.0 ml de triisopropilsilano, con agitación para formar una solución transparente.

Procedimiento de preparación de muestras:

A cada tubo de ensayo que contenía el producto crudo obtenido de la etapa anterior, se agregaron, en orden, 0.4 ml de DMSO y 0.4 ml de MeOH. Después de agitar durante 1 min, en muchos casos se formó una solución transparente. Sin

embargo, si los sólidos aún estaban presentes en el tubo de ensayo, se agregaba más DMSO (0.2 ml), y la mezcla se agitaba durante 2 miNo. En este momento, si quedaban sólidos, se retiraba la solución transparente, y se agregaba más DMSO (hasta 1.0 ml). La solución transparente resultante se sometió a LC-MS preparativa a 2.0 ml por inyección.

Síntesis de Reacción del Compuesto A

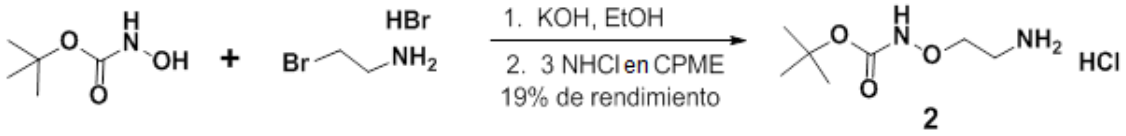


Se agregó DMAP (2.80 g, 23.0 mmol) a una mezcla de ácido pentadecandioico (25.0 g, 92.0 mmol) en 2-Me-THF (250

ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 min, se agregó terc-butanol (13.2 ml, 138 mmol), y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 10 miNo. Una vez que la suspensión resultante se calentó a 60 °C durante 10 min, se tornó una solución incolora transparente. Se agregó una solución de anhídrido de BOC (26.0 g, 119 mmol) en THF (100 ml) durante 2 h en un embudo de adición de presión compensada a la mezcla de reacción anterior a 60 °C. Hacia el final de la adición, la mezcla de reacción se volvió una solución de color rosa claro. La agitación continuó a 60 °C durante 18 h. Después de enfriar hasta 0 °C, se agregaron 100 ml de HCl 1.5 N durante 5 miNo. Luego, la mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 miNo. Después de la separación, la capa orgánica se lavó con salmuera (250 ml x 2), se secó en Na_2SO_4. se filtró y se concentró. El material resultante se suspendió en acetonitrilo (250 ml), se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se filtró para retirar el material de inicio de diácido sin reaccionar. Luego, el filtrado se concentró hasta aproximadamente 125 ml. La suspensión resultante se agitó a 0 °C durante 2 h y, con el tiempo, se tornó más turbia. El sólido resultante se filtró, se lavó con acetonitrilo (2 x 15 ml) frío (0 °C) y se secó, para proporcionar ácido 15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanoico (compuesto **1**. 8.20 g, 25.0 mmol, 27.2 % de rendimiento) como un sólido blancuzco. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 2.35 (t, *J*

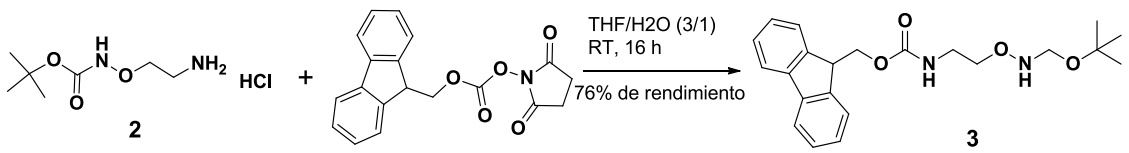
= 7.58 Hz, 2H), 2.20 (t, *J* = 7.46 Hz, 2H), 1.68 – 1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34 – 1.24 (m, 18H). RMN-^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 179.91. 173.44. 79.93, 35.64. 34.08, 29.57, 29.48, 29.46, 29.41. 29.39, 29.29, 29.23, 29.09, 29.06, 28.12. 25.12. 24.70.

Los siguientes compuestos se prepararon de conformidad con el procedimiento anterior, $HO_2C(CH_2)_nCO_2{}^tBu$, n = 10 -18. La separación del producto deseado, monoéster $HO_2C(CH_2)nCO_2{}^tBu$, del diácido sin reaccionar $HO_2C(CH_2)_nCO_2H$ y el diéster sin reaccionar $^tBuO_2C(CH_2)_nCO_2{}^tBu$ se logró, en cada caso, usando sus solubilidades diferentes en acetonitrilo.



Se agregó hidróxido de potasio (74.1 g, 1122 mmol) en porciones durante 10 min a una solución transparente de terc-butil N-hidroxicarbamato (50.0 g, 376 mmol) en etanol anhidro (500 ml) a 0 °C, usando un agitador mecánico. Después de agitar a 0 °C durante 10 min, y luego a temperatura ambiente durante 20 min, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, y se agregó 2-bromoetilamina bromhidrato (100 g, 488 mmol) en porciones durante 15 miNo. Después de agitar a 0 °C durante 30 min, y luego a temperatura ambiente durante 5 h, las suspensiones blancas resultantes se filtraron, y la torta de filtro se lavó con EtOH (40 ml × 2). Los filtrados

combinados se concentraron a un volumen de 100 ml, se extrajeron con *t*-BuOMe (500 ml) y H_2O (250 ml). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con *t*-BuOMe (200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 × 200 ml), se secaron en Na_2SO_4. se filtraron, se concentraron y se secaron en alto vacío para proporcionar un líquido muy viscoso (20.0 g). El líquido resultante se disolvió en *t*-BuOMe (300 ml). Se agregó por goteo HCl (3 M en ciclopentilmetiléter) (40 ml, 120 mmol) a la solución transparente anterior a temperatura ambiente. Se formó una suspensión blanca. Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 h, los sólidos blancos resultantes se filtraron, se lavaron con *t*-BuOMe y se secaron al vacío durante 45 min para proporcionar terc-butil 2-aminoetoxicarbamato clorhidrato (compuesto **2**. 15.5 g, 72.9 mmol, 19,4 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 10.21 (br s, 1H), 8.27 (br s, 2.6H), 3.92 (t, *J* = 5.26 Hz, 2H), 2.98 (t, *J* = 5.26 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H). RMN-^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 157.10. 80.79, 72.00. 37.46, 28.46.

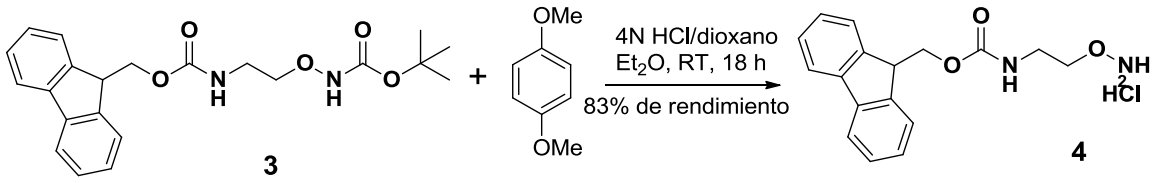


2 **3**

Se agregó bicarbonato de sodio (8.00 g, 95 mmol) a una mezcla agitada de terc-butil 2-aminoetoxicarbamato clorhidrato (compuesto **2**. 13.5 g,

63.5 mmol), Fmoc-OSu (25.7 g, 76.0 mmol) en THF (450 ml) y agua (150 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, todos los componentes volátiles se retiraron al vacío. El residuo se extrajo con EtOAc (400 ml, 200 ml) una vez que la capa acuosa se había saturado con NaCl sólido. Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4, se filtraron y se concentraroNo. El residuo se sometió a cromatografía instantánea en gel de sílice, que se eluyó con EtOAc/hexanos. Las fracciones más puras se combinaron, se concentraron, y el residuo se volvió a purificar usando las condiciones anteriores. Nuevamente, las fracciones más puras se combinaron y se concentraroNo. El residuo se purificó por tercera vez en condiciones idénticas. Las fracciones puras se combinaron, se concentraron y se secaron en alto vacío para proporcionar (compuesto **3**,19,2 g, 48.2 mmol, 76 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 7.78 (d, *J* = 7.32 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.32 Hz, 2H), 7.63, (s, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.232 Hz, 2H), 6.00 (br s, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.26 (t, *J* = 7.10 Hz, 1H), 3.91 (t, *J* = 4.20 Hz, 2H), 3.49 – 3.46 (m, 2H), 1.52 (s, 9H). RMN-^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 157.54. 156.90. 144.06, 141.32. 127.68, 127.08, 125.23, 119.96, 82.11. 75.66, 66.91. 47.30. 39.23,

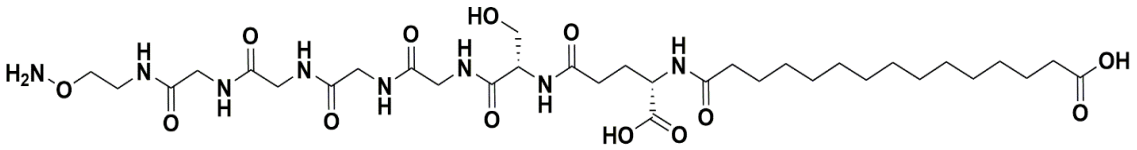
28.24.



3 4

Se agregó HCl (100 ml, 400 mmol, 4 M en dioxano) a temperatura ambiente a una solución agitada de compuesto **3** (8.6 g, 21.6 mmol), 1.4-dimetoxibenceno (7.46 g, 54.0 mmol) en dietiléter (100 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se volvió una suspensión espesa que apenas se podía agitar. Se agregó más éter (400 ml), y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 miNo. Luego, se filtró en nitrógeno, y los sólidos se lavaron con éter (3 × 100 ml) para proporcionar el compuesto **4** (6.36 g, 19.0 mmol, 87 % de rendimiento) como un sólido blanco. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 11.10 (br, s, 2.60 H), 7.89 (d, *J* = 7.58 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.34 Hz, 2H), 7.54 (br t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H), 4.31 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 4.23 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.06 (t, *J* = 5.38 Hz, 2H), 3.28 (q, *J* = 5.22 Hz). RMN-^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6, ppm) δ 156.74. 144.32. 141.22. 128.11. 127.57, 125.64. 120.60. 73.50. 66.08, 47.17,

38.91.



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

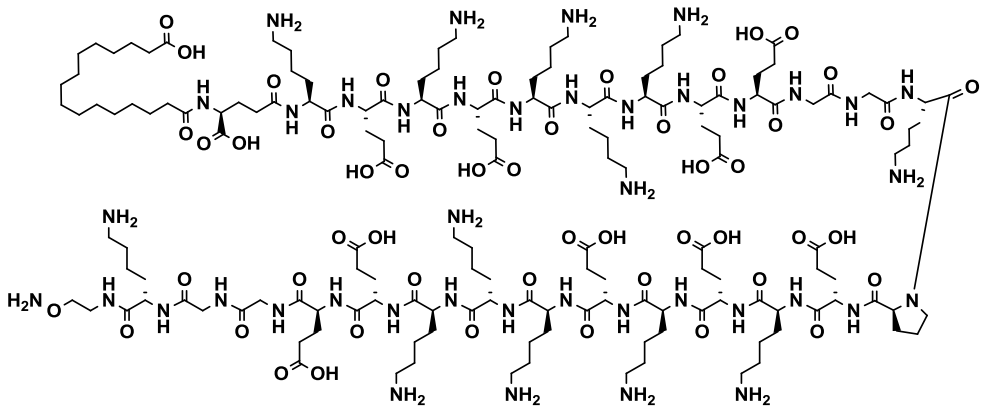
Compuesto A

El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa usando las siguientes condiciones: Columna: XBridge CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo: agua con 0.1 % de ácido triflouroacético; gradiente: 0-34.9% de B durante 23 min, luego un mantenimiento de 2 minutos a 100% de B; flujo: 20 ml/miNo. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La acuosa resultante que contenía el producto deseado se enfrió hasta -78 °C en un flujo de nitrógeno y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título A como un sólido blanco (88 mg, 25.9 % de rendimiento, pureza según LC-CAD de 98,6 %).

Condición A de análisis: Tiempo de retención = 1.24 min; ESI-MS $(M+H)^+$ = 775.30.

Condición B de análisis: Tiempo de retención = 1.05

min; ESI-MS $(M+H)^+$ = 775.25.



KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH

Masa exacta: 3496.97

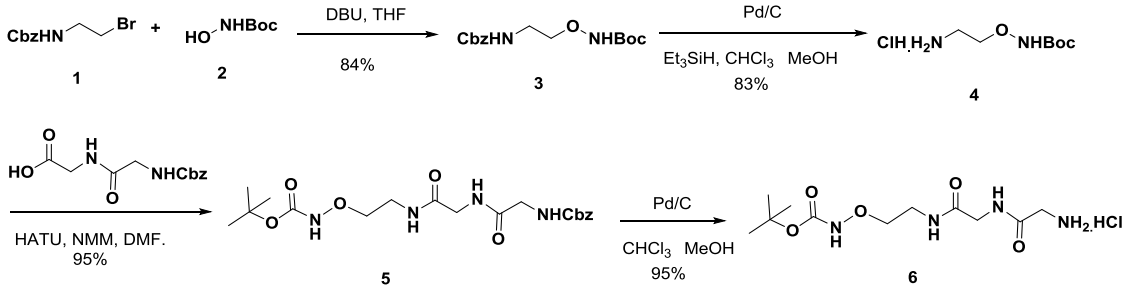
El material crudo se purificó mediante LC/MS preparativa usando las siguientes condiciones: Columna: XBridge C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético; gradiente: 20-70% de B durante 20 min, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100% de B; flujo: 20 ml/miNo. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La acuosa resultante que contenía el producto deseado se enfrió hasta -78 °C en un flujo de nitrógeno y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (47 mg, 3,4 % de rendimiento, pureza según LC-CAD de 72 %).

Condición A de análisis: Tiempo de retención = 1.14 min; ESI-MS $(M+3H)^{+3}$ = 1166.90. $(M+3H)^{+4}$ = 875.45.

Condición B de análisis: Tiempo de retención = 0.991 min; ESI-MS $(M+3H)^{+3}$ = 1166.90. $(M+3H)^{+4}$ = 875.50.

Ejemplo 5: Síntesis de mejoradores PK en fase sólida

Los mejoradores PK descritos en la presente se pueden preparar usando los procedimientos que se ejemplifican más adelante.



(2-(((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)etil)carbamato de Bencilo, 3. Se agregó DBU (26.3 ml, 174 mmol) en porciones a una mezcla en agitación de (2-bromoetil)carbamato de bencilo (30 g, 116 mmol) y hidroxicarbamato de terc-butilo (24.76 g, 186 mmol) en THF (75 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche (se observaron precipitados). La LCMS muestra que solo quedó una cantidad mínima de material de inicio. La mezcla de reacción se concentró, se inactivó con agua, se extrajo con acetato de etilo. Las fases de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua, salmuera, luego se secaron en Na_2SO_4. Después de la concentración, se obtuvieron 45 g de producto crudo que se

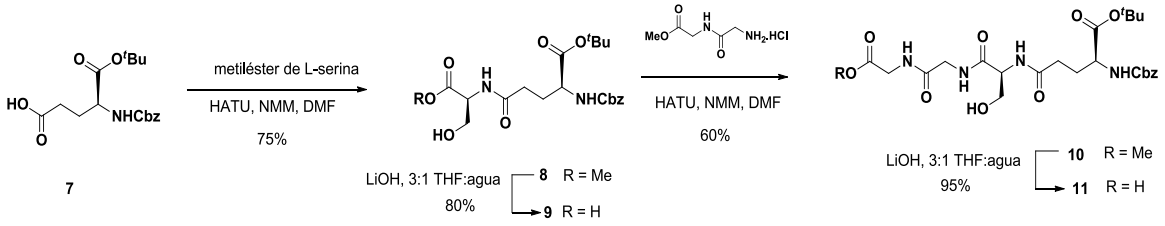
sometieron a separación por cromatografía (0-20 % de acetona en hexano). Después de la separación, se obtuvo (2-(((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)etil)carbamato de bencilo (32.9 g, 106 mmol, 91 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro muy viscoso. ^{1}H NMR (400MHz, CLOROFORMO-d) δ 7.43 - 7.30 (m, 5H), 5.75 (br. s., 1H), 5.32 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.94 - 3.85 (m, 2H), 3.54 - 3.42 (m, 2H), 1.50 (s, 9H).

clorhidrato (2-aminoetoxi)carbamato de terc-butilo, 4. (2-(((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)etil)carbamato de Bencilo (16.4 g, 52.8 mmol) se disolvió en MeOH (161 ml), y se agregó cloroformo (5.33 ml, 66,1 mmol). La solución se purgó con nitrógeno, luego se agregó cuidadosamente Pd/C (2.81 g, 2.64 mmol). La solución luego se enfrió hasta 0 °C, y se agregó por goteo cuidadosamente trietilsilano (76 ml, 476 mmol). Se observó evolución de H_2 durante la adición y era exotérmica. Después de la adición, la reacción se calentó gradualmente hasta temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con metanol adicional, luego se evaporó al vacío. El residuo luego se trituró con hexano, y el sólido resultante se filtró, se lavó con hexano adicional y se secó en succión para proporcionar clorhidrato 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (10.2 g, 48.0 mmol, 91 %

de rendimiento) como un sólido rosado. ^{1}H NMR (400MHz, CLOROFORMO-d) δ 8.78 (br. s., 1H), 8.31 (br. s., 2H), 4.24 (s., 2H), 3.39 (s., 2H), 1.48 (s, 9H).

((3,6,9-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-il)oxi)carbamato de terc-butilo, 5. N-metilmorfolina (5.17 ml, 47.0 mmol) se agregó por goteo a una solución de clorhidrato 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (4 g, 18.81 mmol), ácido 2-(2-(((benciloxi)carbonil)amino)acetamido)acético (5.01 g, 18.81 mmol) y HATU (7.87 g, 20.69 mmol) en DMF anhidro (75 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl 1 No. Luego, la acuosa separada se extrajo con una porción adicional de acetato de etilo, y los orgánicos combinados se lavaron con HCl 1 N, salmuera, solución saturada de bicarbonato de sodio y, luego, se lavaron adicionalmente con salmuera. Luego, las capas orgánicas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron al vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando acetato de etilo-hexano como eluyente para proporcionar 6,25 g (78 %) del compuesto del título. ^{1}H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7.69 (s, 1H), 7.41 - 7.28 (m, 6H), 7.00 - 6.87 (m, 1H), 5.81 (br s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.98 (dd, *J*=16.7, 5.7 Hz, 4H), 3.86 (t, *J*=4.8 Hz, 2H), 3.55 - 3.46 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). MS *m/e* 447.0 ($M+Na^+$).

clorhidrato (2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)etoxi)carbamato de terc-butilo, 6. **5** (6.25 g, 14.72 mmol) se disolvió en metanol anhidro (58.9 ml), y se agregó cloroformo (1.782 ml, 22.09 mmol), y luego Pd-C (1.567 g, 1.472 mmol). El matraz de reacción se purgó con hidrógeno (globo) y se agitó durante 6 h, luego se filtró a través de Celite y se evaporó para proporcionar clorhidrato 2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)etoxicarbamato de terc-butilo (4.87 g, 14.90 mmol, 101 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.00 (br s, 1H), 8.71 (br t, *J*=5.7 Hz, 1H), 8.18 - 7.99 (m, 4H), 3.77 (d, *J*=5.7 Hz, 2H), 3.69 (t, *J*=5.9 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.36 - 3.23 (m, 3H), 1.41 (s, 9H).



2-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(((S)-3-hidroxi-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butilo, 8. Ácido (S)-4-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (**7**, obtenido de ChemImpex) (15 g, 44.5 mmol) y clorhidrato 2-amino-3-hidroxipropanoato de (S)-metilo (6.92 g, 44.5 mmol) se disolvieron en DMF (148 ml), y la solución se enfrió hasta 0 °C. Se agregó HATU (18.60 g, 48.9 mmol), y luego, N-metilmorfolina (12.22 ml, 111 mmol). La reacción se agitó a 0 °C en N_2 durante 2 h. La mezcla de

reacción se diluyó con EtOAc, se inactivó con HCl 1N, luego se lavó con $NaHCO_3$ saturado y salmuera. La fase orgánica se secó en Na_2SO_4 anhidro y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante purificación cromatográfica (0-40 % acetona/hexano) para proporcionar 2-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(((S)-3-hidroxi-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butilo (16.31 g, 36.5 mmol, 82 % de rendimiento) como un sólido blancuzco. RMN-^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.37 (m, 5H), 6.5 (bs, 1H), 5.53 (m, 1H); 5.1(s, 2H), 4.7(m, 1H), 4.28(m, 1H), 4.1(bs, 1H), 3.95(m, 1H), 3.8(s, 3H), 2.4(m, 2H), 2.3(M,1H), 1.7(m, 1H), 1.5(s, 9H); MS *m/e* 439.2 ($M+H^+$).

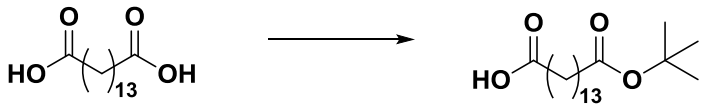
Ácido (S)-2-((S)-4-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanamido)-3-hidroxipropanoico, 9. 2-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(((S)-3-hidroxi-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)-5-oxopentanoato de (S)-terc-butilo (14 g, 31.9 mmol) se disolvió en THF (106 ml) y agua (53,2 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Luego de agitar durante 30 minutos, se agregó LiOH (0.688 g, 28,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en N_2. Una vez que se completó la reacción, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a ~4 a 0 °C. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). La fase orgánica combinada se secó en Na_2SO_4 anhidro y se concentró en vapor giratorio para proporcionar ácido (S)-2-((S)-4-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-

oxopentanamido)-3-hidroxipropanoico (13.01 g, 30.7 mmol, 96 % de rendimiento) como un sólido blancuzco. MS *m/e* 425.0 ($M+H^+$).

5-(terc-butoxicarbonil)-10-(hidroximetil)-3,8,11,14-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadecan-17-oato de (5S,10S)-metilo, 10. clorhidrato de 2-(2-aminoacetamido)acetato de metilo (5 g, 27.4 mmol) se disolvió en DMF (116 ml), y se cargó ácido (S)-2-((S)-4-(((benciloxi)carbonil)amino)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanamido)-3-hidroxipropanoico (11.62 g, 27.4 mmol). A esta mezcla de reacción, se agregó HATU (11.45 g, 30.1 mmol) y N-metilmorfolina (7.53 ml, 68.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en N_2 durante 12 h. LC/MS y HPLC indicaron la finalización de la reacciÓNo. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (150 ml) y se inactivó con HCl 1No. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (50 ml), $NaHCO_3$ acuoso (50 ml) y, finalmente, salmuera (3 x 50 ml). La capa orgánica se secó en Na_2SO_4 anhidro y se evaporó al vacío para proporcionar el producto deseado como un aceite espeso, que se utilizó para la purificación cromatográfica (0 - 10 % de MeOH/DCM) para proporcionar el producto deseado (5S,10S)-metil 5-(terc-butoxicarbonil)-10-(hidroximetil)-3,8,11,14-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadecan-17-oato (14 g, 25,3 mmol, 93 % de rendimiento) como un aceite espeso. RMN-^{1}H ($CDCl_3$, 400

MHz) δ 7.38 (m, 5H), 5.1 (m, 2H), 4.0 (m, 6H), 3.7(s, 3H), 2.4(m, 2H), 2.2 (M, 1H), 1.9(m, 1H), 1.45(s, 9H); MS m/e 553.2 ($M+H^+$).

Ácido (5S,10S)-5-(terc-butoxicarbonil)-10-(hidroximetil)-3,8,11,14-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadecan-17-oico, 11. (5S,10S)-metil (5S,10S)-metil 5-(terc-butoxicarbonil)-10-(hidroximetil)-3,8,11,14-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadecan-17-oato (20 g, 36,2 mmol) se disolvió en THF (193 ml) y agua (97 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Luego de agitar durante 30 minutos, se agregó LiOH (0.780 g, 32.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C en N2 durante 5h. El progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS y HPLC. Una vez que se completó la reacción, se diluyó con EtOAC (150 ml) y se neutralizó mediante HCl 1No. La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml), se secó en Na_2SO_4 anhidro, se concentró al vacío y se secó en alto vacío durante 12 h para proporcionar el producto deseado como un sólido blancuzco (18 g, 96 % de rendimiento). MS m/e 539.1 ($M+H^+$).



12 **13**

Ácido 15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanoico, 13. Una suspensión de ácido pentadecandioico (20.2 g, 70.5

mmol) en anhídrido acético (70 ml) se calentó hasta 128 °C en Ar. La solución resultante se agitó a esta temperatura durante 6.0 h y luego se enfrió a temperatura ambiente. La solución se diluyó con tolueno (100 ml) y se evaporó. El residuo se despojó con tolueno (4 x 80 ml) y se secó al vacío durante 6.5 h para proporcionar 27.53 g de un sólido blancuzco. A una mezcla del sólido mencionado (27.53 g) y *t*-butanol (235 ml), a temperatura ambiente y en Ar, se agregó 4-dimetilaminopiridina (34.8 g, 282 mmol) en tres porciones durante un período de 15 miNo. La mezcla se calentó hasta 50 °C, y la solución resultante se agitó a esta temperatura durante 34.0 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con tolueno (50 ml) y se evaporó. El residuo se despojó con tolueno (2 x 100 ml) y luego se absorbió en 9/1 de éter/CH_2Cl_2 (600 ml). La solución se lavó con HCl 1*M* (400 ml), HCl 0.5*M* (400 ml), agua (300 ml) y salmuera (300 ml). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se evaporó. El crudo se absorbió en CH_2Cl_2 (50 ml) y se sometió a ultrasonido. La suspensión resultante se filtró a través de un embudo fritado medio, y el sólido en el embudo se enjuagó con dos porciones pequeñas de CH_2Cl_2. El filtrado y los enjuagues se combinaron y se evaporaroNo. El concentrado se sometió a cromatografía (120 g de cartucho de columna instantánea, CH_2Cl_2 a CH_2Cl_2/i-PrOH 9/1) para proporcionar, en orden de

elución:

- una mezcla ~5/1 (7.19 g, aceite incoloro) de di-*terc-butil* pentadecandioato y ácido 15-(*terc*-butoxi)-15-oxopentadecanoico.

- ácido 15-(*terc*-butoxi)-15-oxopentadecanoico (4.38 g, 19 % de rendimiento) como un sólido blanco: LC/MS $[M-H]^{-1}$ = 327; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.37 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 2.22 (t, *J*= 7.5 Hz, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.28 (m, 18H).

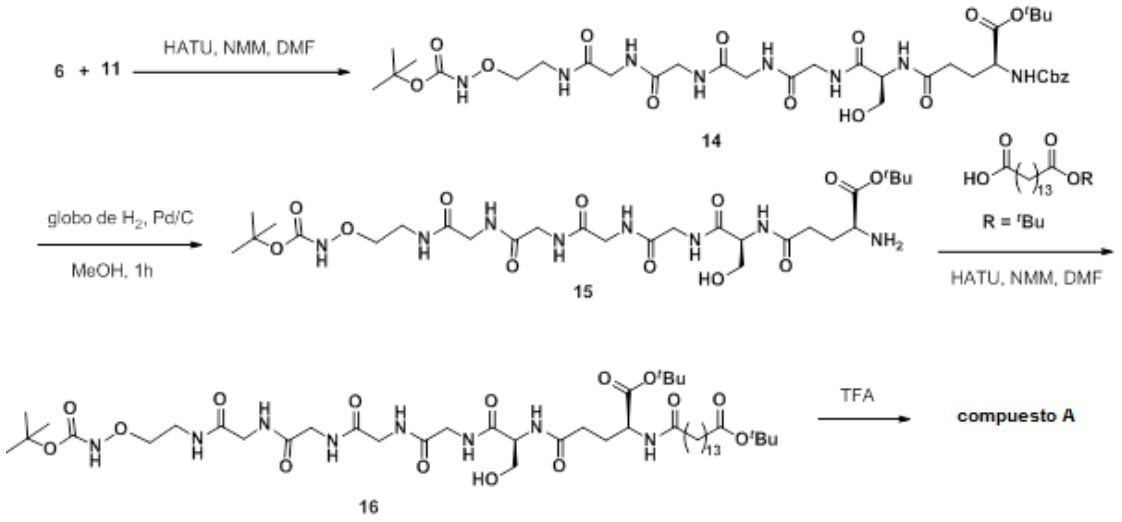
- una mezcla ~4/1 (4.42 g, sólido blancuzco) de ácido 15-(*terc*-butoxi)-15-oxopentadecanoico y ácido pentadecandioico.

La mezcla de di- y mono *terc-butil* ésteres (7,19 g) se separó mediante cromatografía (120 g de cartucho de columna instantánea, CH_2Cl_2 a 9/1 CH_2Cl_2/i-PrOH) para proporcionar una cantidad adicional de ácido 15-(*terc*-butoxi)-15-oxopentadecanoico (0.8 g, 4 % de rendimiento) como un sólido blanco.

La mezcla de mono éster de *terc-butilo* y diácido (4.42 g) se separó mediante cromatografía (330 g de cartucho de columna instantánea, Hex a Hex/acetona 4/1) para proporcionar una cantidad adicional de ácido 15-(*terc*-butoxi)-15-oxopentadecanoico (2.92 g, 13 % de rendimiento) como un sólido blanco.

La cantidad aislada total del ácido 15-(*terc*-

butoxi)-15-oxopentadecanoico era 8.1 g (36 % de rendimiento).



N2-((benciloxi)carbonil)-N5-((S)-1-((2-((2-((2-((2,2-dimetil-4,10-dioxo-3,6-dioxa-5,9-diazaundecan-11-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)-L-glutaminato de terc-butilo, 14.

Clorhidrato de 2-(2-(2-aminoacetamido)acetamido)etoxicarbamato de Terc-butilo (3.73 g, 11.41 mmol) y ácido (5S,10S)-5-(terc-butoxicarbonil)-10-(hidroximetil)-3,8,11,14-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,9,12,15-tetraazaheptadecan-17-oico (5.85 g, 10.87 mmol) se disolvieron en DMF (36.2 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió hasta 0 °C antes de agregar HATU (4.55 g, 11.96 mmol), y luego se agregó por goteo N-metilmorfolina (2.99 ml, 27.2 mmol). La reacción se calentó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se enfrió hasta 0°C antes de inactivarse con agua helada y se agitó vigorosamente a medida que se derretía el

hielo. Una vez que se derritió todo el hielo que rodeaba el matraz, se formó un precipitado que luego se filtró con succión durante la noche (lentamente). El sólido ceroso resultante se disolvió en metanol (200 ml) antes de evaporarse. El tratamiento con metanol (aproximadamente 20 ml) y la posterior adición de dietiléter precipitaron el producto, que se recolectó mediante succión para proporcionar 6.4 g de 28-(((benciloxi)carbonil)amino)-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25-heptaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24-heptaazanonacosan-29-oato de (23S,28S)-terc-butilo (73 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.24 - 8.01 (m, 5H), 7.87 (br t, J=5.6 Hz, 1H), 7.62 (br d, J=7.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 5H), 5.10 - 4.96 (m, 3H), 4.30 - 4.24 (m, 1H), 4.10 (q, J=5.3 Hz, 3H), 3.93 - 3.84 (m, 1H), 3.80 - 3.53 (m, 13H), 3.31 - 3.23 (m, 2H), 3.17 (d, J=5.3 Hz, 7H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.35 - 2.20 (m, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 1H), 1.82 - 1.71 (m, 1H), 1.42 - 1.24 (m, 20H). MS m/e 811.4 ($M+H^+$).

N5-((S)-1-((2-((2-((2-((2,2-dimetil-4,10-dioxo-3,6-dioxa-5,9-diazaundecan-11-il)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-3-hidroxi-1-oxopropan-2-il)-L-glutaminato de terc-butilo, 15. Se agregó metanol (158 ml) en una porción a 28-(((benciloxi)carbonil)amino)-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25-heptaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24-heptaazanonacosan-29-oato de

(23S,28S)-terc-butilo (6.4 g, 7.89 mmol), y el sólido se agitó en una atmósfera de nitrógeno hasta que se disolvió la amina (aproximadamente 3h). Luego, se agregó Pd/C (0.840 g, 0.789 mmol), y la atmósfera de hidrógeno se introdujo a través de un globo. La reacción se agitó a temperatura ambiente, luego se filtró a través de un filtro de papel de vidrio, y el filtrado se evaporó para proporcionar 4.8 g de 28-amino-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25-heptaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24-heptaazanonacosan-29-oato de (23S,28S)-terc-butilo (90 % de rendimiento) como un sólido frágil blancuzco.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.29 - 8.19 (m, 1H), 8.17 - 7.96 (m, 3H), 7.87 (br t, *J*=5.7 Hz, 1H), 5.00 (br s, 1H), 4.28 - 4.08 (m, 1H), 3.78 - 3.56 (m, 10H), 3.30 - 3.14 (m, 3H), 2.90 (s, 1H), 2.75 - 2.67 (m, 1H), 2.34 - 2.06 (m, 3H), 1.87 - 1.74 (m, 1H), 1.68 - 1.50 (m, 1H), 1.41 (d, *J*=4.3 Hz, 15H), 1.10 (s, 1H).

(23S,28S)-28-(terc-butoxicarbonil)-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25,30-octaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24,29-octaazatetratetracontan-44-oato de terc-butilo, 16.

N-metilmorfolina (1.950 ml, 17.73 mmol) se agregó por goteo a una solución parcial de 28-amino-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22.25-heptaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24-heptaazanonacosan-29-oato de

(23S,28S)-terc-butilo (4.8 g, 7.09 mmol), ácido 15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanoico (2.446 g, 7.45 mmol) y HATU (2.97 g, 7.80 mmol) a 0 °C en una atmósfera de nitrógeno. Se agregaron 20 ml adicionales de DMF para solubilizar la mezcla de reacción que se calentó lentamente a temperatura ambiente durante la noche. Luego, la reacción se enfrió en un baño de hielo antes de inactivarse con hielo y fundirse mientras la mezcla se agitaba vigorosamente. El sólido se filtró para proporcionar un sólido gomoso (6,1g) que se transfirió a SFC para la purificación. La purificación mediante SFC proporcionó 28-(terc-butoxicarbonil)-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25,30-octaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24,29-octaazatetratetracontan-44-oato de (23S,28S)-terc-butilo (2.5 g, 2.53 mmol, 35,7 % de rendimiento) como un sólido blanco que se usó en la siguiente etapa. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.96 (br s, 1H), 8.23 - 8.02 (m, 1H), 7.97 (br d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.84 (t, *J*=5.8 Hz, 1H), 4.96 (t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.32 - 4.21 (m, 1H), 4.17 - 4.03 (m, 1H), 3.85 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 3.76 (br d, *J*=5.1 Hz, 1H), 3.72 - 3.55 (m, 1H), 3.30 - 3.24 (m, 1H), 2.27 - 2.07 (m, 1H), 2.01 - 1.86 (m, 1H), 1.80 - 1.65 (m, 1H), 1.49 - 1.38 (m, 5H), 1.35 (br s, 1H), 1.29 - 1.16 (m, 4H). MS *m/e* 987.7 ($M+H^+$).

Ácido (17S,22S)-1-(aminooxi)-22-carboxi-17-(hidroximetil)-4,7,10,13,16,19,24-heptaoxo-3,6,9,12,15,18,23-

heptaazaoctatriacontan-38-oico, compuesto A. 28-(terc-butoxicarbonil)-23-(hidroximetil)-2,2-dimetil-4,10,13,16,19,22,25,30-octaoxo-3,6-dioxa-5,9,12,15,18,21,24,29-octaazatetratetracontan-44-oato de (23S,28S)-terc-butilo (2.5 g, 2.53 mmol) se disolvió en una mezcla de lavado 25 ml + 10 ml de TFA:TIPS 92:8 enfriado. La solución se agregó directamente al sólido blanco y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La solución se enfrió a 0 °C y 320 ml de heptano: Se agregaron 40 ml de MTBE antes de transferir al refrigerador durante la noche. Se separó un aceite transparente que era visible en el fondo del matraz. El sobrenadante se retiró, y se agregó dietiléter frío (1 l). El sólido blanco resultante se agitó durante 2 h antes de filtrar y secar rápidamente en un embudo Büchner para proporcionar 2.1 g de ácido (17S,22S)-1-(aminooxi)-22-carboxi-17-(hidroximetil)-4,7,10,13,16,19,24-heptaoxo-3,6,9,12,15,18,23-heptaazaoctatriacontan-38-oico (95 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.42 - 8.34 (m, 1H), 8.20 - 7.95 (m, 3H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.61 (dd, J=10.9, 4.6 Hz, 1H), 4.48 (dd, J=10.8, 7.5 Hz, 1H), 4.30 - 4.03 (m, 1H), 3.93 - 3.30 (m, 10H), 2.47 - 2.39 (m, 1H), 2.33 (dt, J=3.7, 1.9 Hz, 1H), 2.27 - 2.08 (m, 3H), 2.05 - 1.91 (m, 1H), 1.82 - 1.69 (m, 1H), 1.52 - 1.43 (m, 2H), 1.24 (s, 9H), 1.21 - 1.00 (m, 1H). El análisis de HPLC con detección de CAD indicó un 81 % de pureza, Agilent 1100 LC/UV/CAD, ACE C18-300

300 X 4.6 mm ID, 5µm, A: Agua, 0.05 % de TFA;B: ACN, 0.05 % de TFA.

Ejemplo 6: Síntesis de la fase de solución de mejoradores PK adicionales

Condición A del análisis de LCMS: Columna: Waters Acuity UHPLC BEH C18, 2.1 × 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 0.05% de TFA; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 0.05% de TFA; temperatura: 50 °C; gradiente: 0-100% de B durante 3 min, luego un mantenimiento de 1.0 minutos a 100% de B; flujo: 1 ml/min; detección: masa.

Condición B del análisis de LCMS: Columna: Waters Acuity UHPLC BEH C18, 2.1 × 50 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 10 mM de acetato de amonio; temperatura: 50 °C; gradiente: 0-100% de B durante 3 min, luego un mantenimiento de 1.0 minutos a 100% de B; flujo: 1.0 ml/min; detección: masa.

Condición A del análisis de UHPLC-ELSD: Condiciones de HPLC: Columna: Waters BEH C18, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA; fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 50 % de B de 0 min a 15 min, 50 % de B a 60 % de B de 16 min a 20 min, 60 % de B a 95 % de B de 21 min a 26 min, luego un mantenimiento de 4.0 min a 95 % de B;

tiempo posterior a la corrida: 4 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 5 µl de muestra de 1 mg/ml en 50/50 de MeCN/agua; **Condiciones de MS**: Intervalo de masa m/z 120 – 2000. Ionización y modo: Ionización por electrorrocío, modo ion positivo **Condiciones de ELSD**: Aumento: 20. Temperatura del tubo de deriva: 60 °C. Velocidad de flujo gaseoso: 40 psi (2.81 kfg/cm^2).

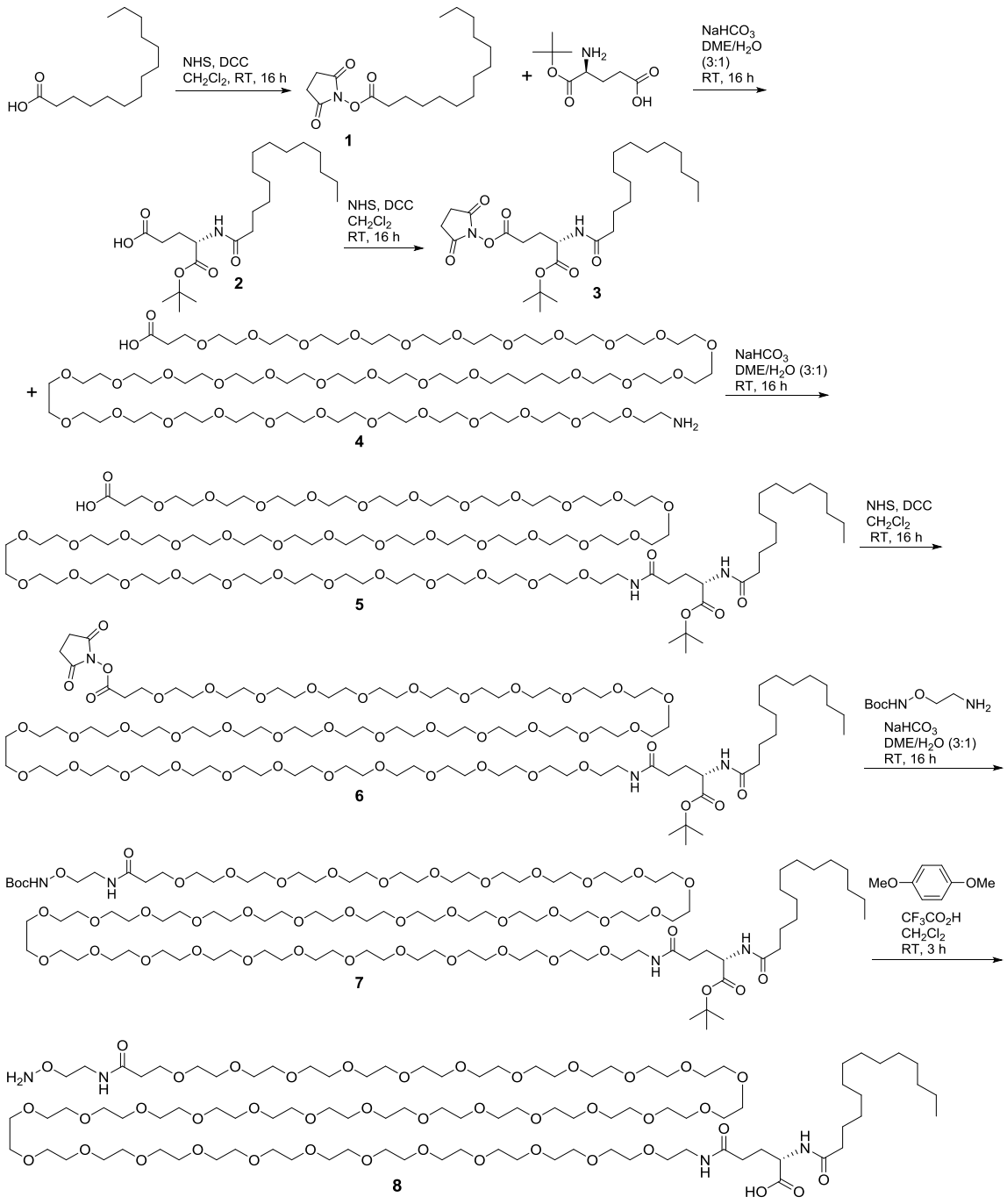
Condición B del análisis de UHPLC-ELSD: Condiciones de HPLC: Columna: Waters BEH CSH C18, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA, fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 95 % de B de 0 min a 24 min, luego un mantenimiento de 3,0 min a 95 % de B; tiempo posterior a la corrida: 4 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 2 µl de muestra de 1 mg/ml en 50/50 de MeCN/agua; **Condiciones de MS**: Intervalo de masa m/z 120 – 2000. Ionización y modo: Ionización por electrorrocío, modo ion positivo **Condiciones de ELSD**: Aumento: 50. Temperatura del tubo de deriva: 60 °C. Velocidad de flujo gaseoso: 40 psi (2.81 kgf/cm^2).

Condición C del análisis de UHPLC-CAD: Condiciones de HPLC: Columna: Waters BEH Phenyl, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA,

fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 95 % de B de 0 min a 25 min, luego un mantenimiento de 2.0 min a 95 % de B; tiempo posterior a la corrida: 4 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 5 µl de muestra de 1 mg/ml en MeOH; **Condiciones MS:** Intervalo de masa m/z 120 – 2000. Ionización y modo: Ionización por electrorrocío, modo ion positivo **Condiciones de CAD:** Intervalo : 100PA. Velocidad de flujo gaseoso: 35 psi (2.46 kgf/cm^2).

Condición D del análisis de UHPLC-CAD: Condiciones de HPLC: Columna: Waters BEH Phenyl, 150 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm; fase móvil A: agua con 0.05 % de TFA, fase móvil B: acetonitrilo con 0.05 % de TFA; temperatura: 35°C; perfil de gradiente: 10 % de B a 35 % de B de 0 min a 15 min, 35 % de B a 95 % de B de 16 min a 25 min, luego un mantenimiento de 2.0 min a 95 % de B; tiempo posterior a la corrida: 3 min (en las condiciones iniciales de fase móvil); velocidad de flujo: 0.35 ml/min; volumen de inyección: 2 µl de muestra de 1 mg/ml en 50/50 de MeOH/agua; **Condiciones de MS:** Intervalo de masa m/z 120 – 2000. Ionización y modo: Ionización por electrorrocío, modo ion positivo **Condiciones de CAD:** Intervalo: 100PA. Velocidad de flujo gaseoso: 35 psi (2.46 kgf/cm^2).

Síntesis de PEG_{36}-Glu^{γ}-C_{13}-CH_3 (8).



tetradecanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1). DCC en CH_2Cl_2 (1M, 99 ml, 99 mmol) se agregó a una solución agitada de ácido tetradecanoico (20.55 g, 90 mmol) en DMF

(100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró, se concentró y se secó en alto vacío. Los sólidos resultantes se suspendieron en éter/hexanos (1:3, 80 ml) durante 45 min, se recolectaron mediante filtración y se secaron para proporcionar 2.5-dioxopirrolidin-1-il tetradecanoato (**1**) (16,96 g, 52.1 mmol, 58 % de rendimiento) como un sólido blanco, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ácido (S)-5-(terc-butoxi)-5-oxo-4-tetradecanamidopentanoico (2). Se agregó agua (150 ml) a una mezcla agitada de ácido (S)-4-amino-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (10.5 g, 51.7 mmol), tetradecanoato de 2.5-dioxopirrolidin-1-ilo (**1**) (16.81 g, 51.7 mmol) y $NaHCO_3$ (5.21 g, 62.0 mmol) en DME (450 ml). La solución transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El DME se retiró al vacío, y luego se agregó HCl acuoso (1 M, 67.2 ml, 67.2 mmol) para ajustar el pH a 2-3. La suspensión resultante se agitó a 0 °C durante 30 min, y luego se filtró. El sólido blanco resultante se secó azeotrópicamente con DME (2x), luego se suspendió en éter/hexanos 1:3 (160 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido blanco se recolectó mediante filtración y se secó en alto vacío para proporcionar ácido (S)-5-(terc-butoxi)-5-oxo-4-tetradecanamidopentanoico (**2**) (8.5 g, 21 mmol, 40 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa

sin purificación adicional.

2-tetradecanamidopentandioato de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo (3). Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1M, 26.6 ml, 26,6 mmol) a una mezcla agitada de ácido (S)-5-(terc-butoxi)-5-oxo-4-tetradecanamidopentanoico (**2**) (10.0 g, 24.2 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diono (3.06 g, 26.6 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró y se concentró. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice, se eluyó con EtOAc/hexanos (1:2) para proporcionar 2-tetradecanamidopentandioato de 5-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo (**3**) (8.95 g, 17.5 mmol, 73 % de rendimiento) como un sólido blanco. RMN-^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 6.29 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.58 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.70 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.60 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (m, 20H), 0.86 (t, J = 6.3 Hz, 3H). RMN-^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ ppm 173.0. 170.3, 168.7, 167.6, 82.4. 51.2. 36.0. 31.5, 29.29. 29.27, 29.25, 29.11. 28.97, 28.92. 27.6, 27.15, 27.10. 25.21. 25.11. 22.3, 13.7.

Compuesto 5. Se agregó agua (4.5 ml) a temperatura ambiente a una mezcla agitada de compuesto **4** (750 mg, 0.448 mmol), 2-tetradecanamidopentandioato de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo **3** (297 mg, 0.582

mmol) y $NaHCO_3$ (75 mg, 0.90 mmol) en DME (13,5 ml). Después de que la solución transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se agregó HCl (1M, 0.896 ml, 0.896 mmol) acuoso, y la mezcla se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4OAc acuoso (monitoreado mediante ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **5** (610 mg, 66 % de rendimiento) como un sólido blanco. $(M+2H)^{2+}$ 1036, $(M+3H)^{3+}$ 691.

Compuesto 6. Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1 M, 0.32 ml, 0.32 mmol) a una mezcla agitada del compuesto **5** (550 mg, 0.266 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (36.7 mg, 0.319 mmol) en CH_2Cl_2 (12 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **6** como un sólido blanco, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

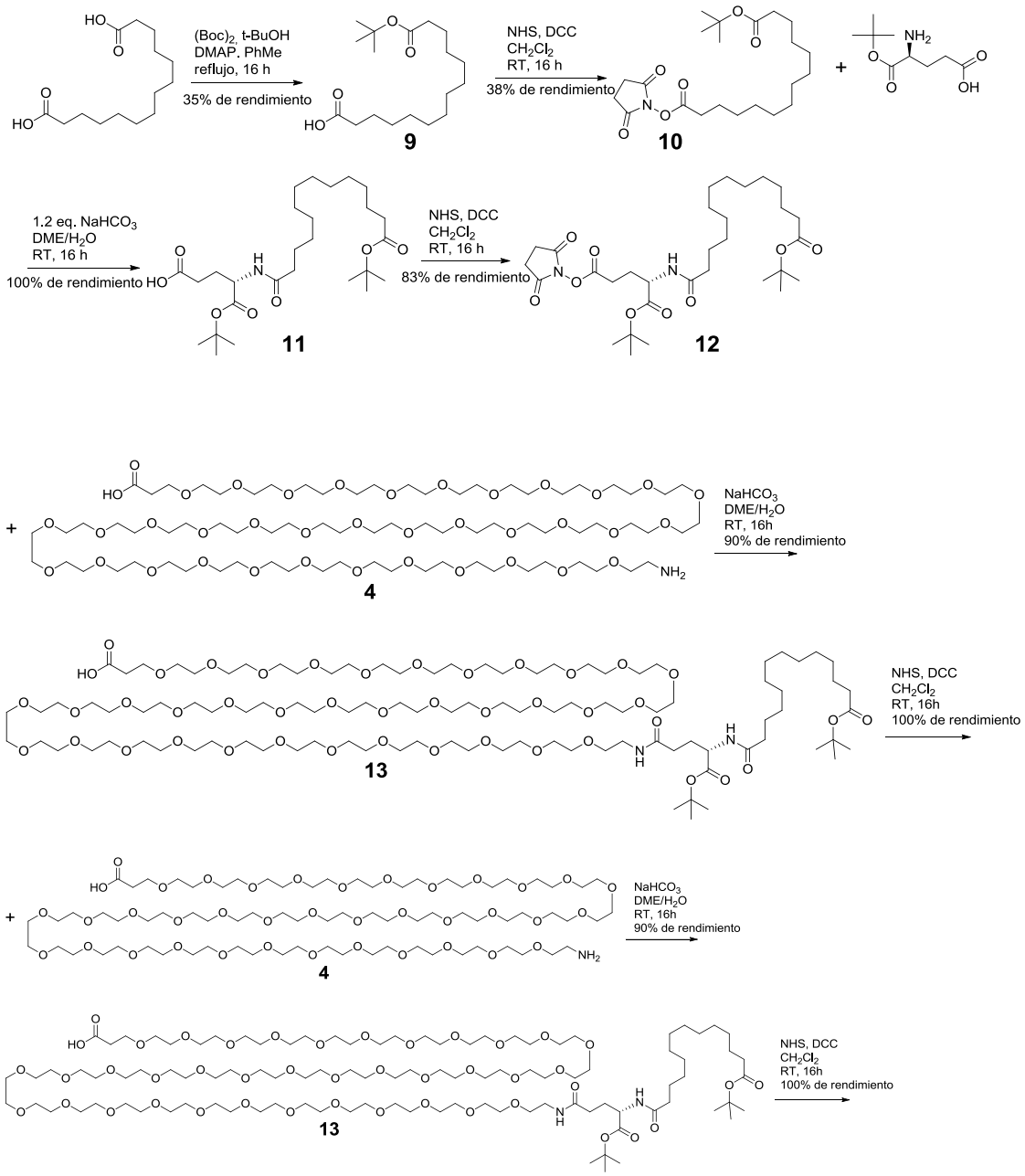
Compuesto 7. Se agregó agua (2.5 ml) a una mezcla agitada de compuesto **6** (577 mg, 0.266 mmol), 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (Miao, Z.; Liu, J.; Norman, T.; Driver, R. WO 2006/069246) (70.3 mg, 0.399 mmol)

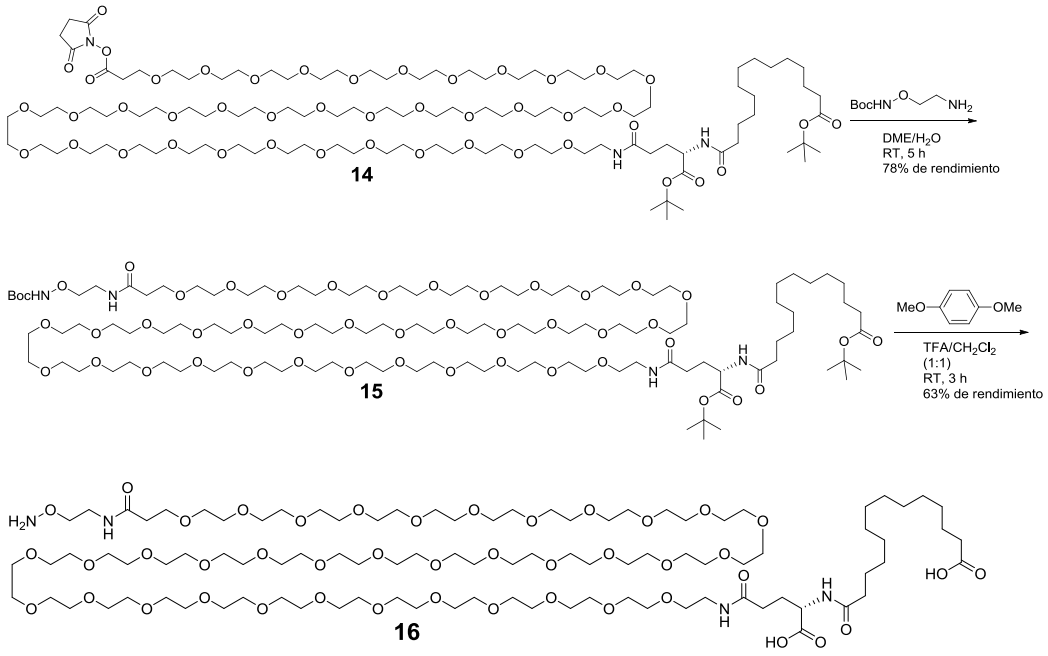
y $NaHCO_3$ (33.5 mg, 0.40 mmol) en DME (7,5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4Cl acuoso (monitoreado mediante ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **7** (360 mg, 61% de rendimiento) como un sólido blanco. $(M+2H)^{2+}$ 1115, $(M+3H)^{3+}$ 743.

Compuesto 8. Se agregó TFA (2 ml) a una mezcla agitada de compuesto **7** (274 mg, 0.123 mmol), 1,4-dimetoxibenceno (155 mg, 1.12 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y luego se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4OCl acuoso (monitoreado mediante ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **8** (228 mg, 84% de rendimiento) como un sólido blanco. Se determinó

que la pureza de UHPLC-ELSD era de 93,3 % mediante la condición A del análisis de UHPLC-ELSD. $(M+2H)^{2+}$ 1037, $(M+3H)^{3+}$ 691.

Síntesis de PEG_{36}-Glu^{γ}-C_{13}-CO_2H (16).





Ácido de 14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanoico (9). Un matraz de fondo redondo de 1 l secado al fuego se cargó con ácido tetradecandioico (21 g, 81 mmol), DMAP (9.93 g, 81 mmol) y tolueno (300 ml). Una vez que la mezcla se agitó a tempratura ambiente durante 15 min, se agregaron 2-metilpropan-2-ol (11.7 ml, 122 mmol) y dicarbonato de di-terc-butilo (26.6 g, 122 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se calentó a 116 °C durante 15 h. La mezcla se concentró, y el residuo se sometió a cromatografía instantánea en gel de sílice, que se eluyó con EtOAc/hexanos (1:2) que contenía 1 % de HOAc, para proporcionar ácido 14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanoico (**9**) (9.0 g, 29 mmol, 35 % de rendimiento). El material era aproximadamente 80 % puro según RMN-^{1}H (la mayor impureza era

el di-terc-butiléster) y se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

14-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) tetradecandioato de 1-terc-butilo (10). Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1M, 59.6 ml, 59.6 mmol) a una solución agitada de ácido 14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanoico (**9**) (12.5 g, 39.8 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (6.86 g, 59.6 mmol) en CH_2Cl_2 (200 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró y luego se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice, se eluyó con CH_2Cl_2 para proporcionar tetradecandioato 14-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-terc-butilo (**10**) (6.2 g, 15 mmol, 38 % de rendimiento) como un sólido blanco. RMN-^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2.84 (br s, 4H), 2.60 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (m, 2H), 1.26 (m, 14H). RMN-^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) d 173.4. 169.2. 168.7, 79.9, 35.6, 31.0. 29.54. 29.51. 29.47, 29.34. 29.31. 29.09, 28.8, 28.1. 25.6, 25.1.

Ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)-5-oxopentanoico (11) Se agregó agua (40 ml) a una mezcla agitada de ácido (S)-4-amino-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (1.600 g, 7.87 mmol), 14-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de tetradecandioato de 1-terc-butilo (**10**) (3.6 g, 7.87 mmol) y $NaHCO_3$ (0.794 g, 9.45 mmol) en DME (120 ml). La solución transparente resultante se agitó a

temperatura ambiente durante la noche. El DME se retiró al vacío, y se agregó HCl acuoso (1 M, 9.45 ml, 9.45 mmol) para ajustar el pH a 2-3. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (1 × 250 ml, 2 × 50 ml) mientras que la capa acuosa se saturó con NaCl sólido. Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4, se filtraron, se concentraron y se secaron en alto vacío para proporcionar ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)-5-oxopentanoico (**11**) (5.14 g, 10.3 mmol) como un sólido blanco que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

2-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)pentandioato de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo (12). Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1 M, 11.8 ml, 11.8 mmol) a una solución agitada de ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)-5-oxopentanoico (**11**) (3.93 g, 7.87 mmol), y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (1.359 g, 11.81 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y luego se filtró. El filtrado se concentró al vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice, se eluyó con EtOAc/CH_2Cl_2 (1:19) para proporcionar 2-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)pentandioato de 5-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de ((S)-1-terc-butilo (**12**) (3.2 g, 68 % de rendimiento). RMN-^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 6.27 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.59 (m,

1H), 2.84 (s, 4H), 2.71 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 2.22 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 2.18 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 2.08 (m, 1H), 1.58 (m 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (m, 16H). RMN-^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) d 173.41. 173.37, 170.7, 169.1. 168.0. 82.8, 79.9, 51.6, 36.4. 35.6, 29.58, 29.47, 29.35, 29.30. 29.10. 28.12. 27.99, 27.55, 27.50. 25.59, 25.48, 25.13.

Compuesto 13. Se agregó agua (4 ml) a una mezcla agitada de compuesto **4** (750 mg, 0.448 mmol) (adquirido de Quanta BioDesign, Powell, Ohio), 2-(14-(terc-butoxi)-14-oxotetradecanamido)pentandioato de (5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de S)-1-terc-butilo (**12**) (401 mg, 0.672 mmol) y $NaHCO_3$ (45.1 mg, 0.537 mmol) en DME (12 ml). Una vez que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se agregó HCl acuoso (1 M, 0.537 ml, 0.537 mmol). La mezcla se concentró al vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4Cl acuoso (monitoreado mediante ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **13** (870 mg, 90% de rendimiento) como un sólido blanco. $(M+2H)^{2+}$ 1079, $(M+3H)^{3+}$ 719.

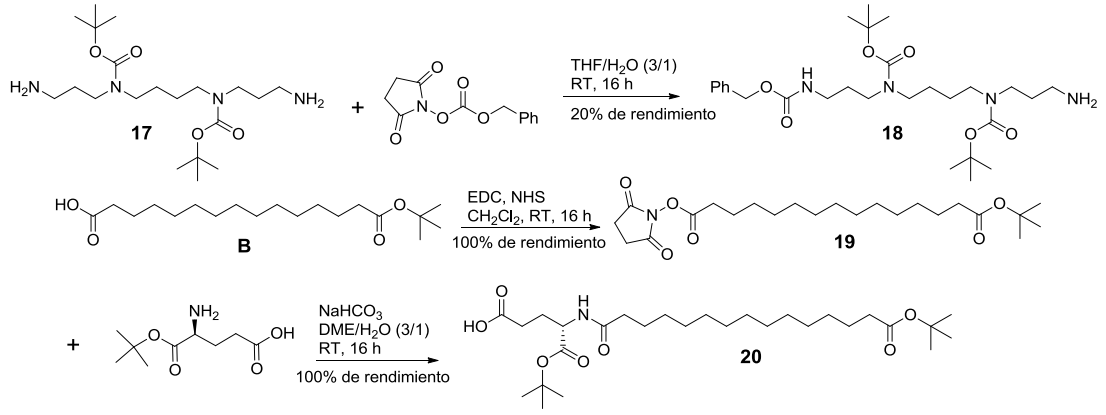
Compuesto 14. Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1 M, 0.605 ml, 0.605 mmol) a una mezcla agitada del compuesto **13** (870 mg, 0.403 mmol), y 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (69,6 mg, 0.605 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se filtró, se concentró y se secó en alto vacío para proporcionar el compuesto **14** como un sólido blanco, que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

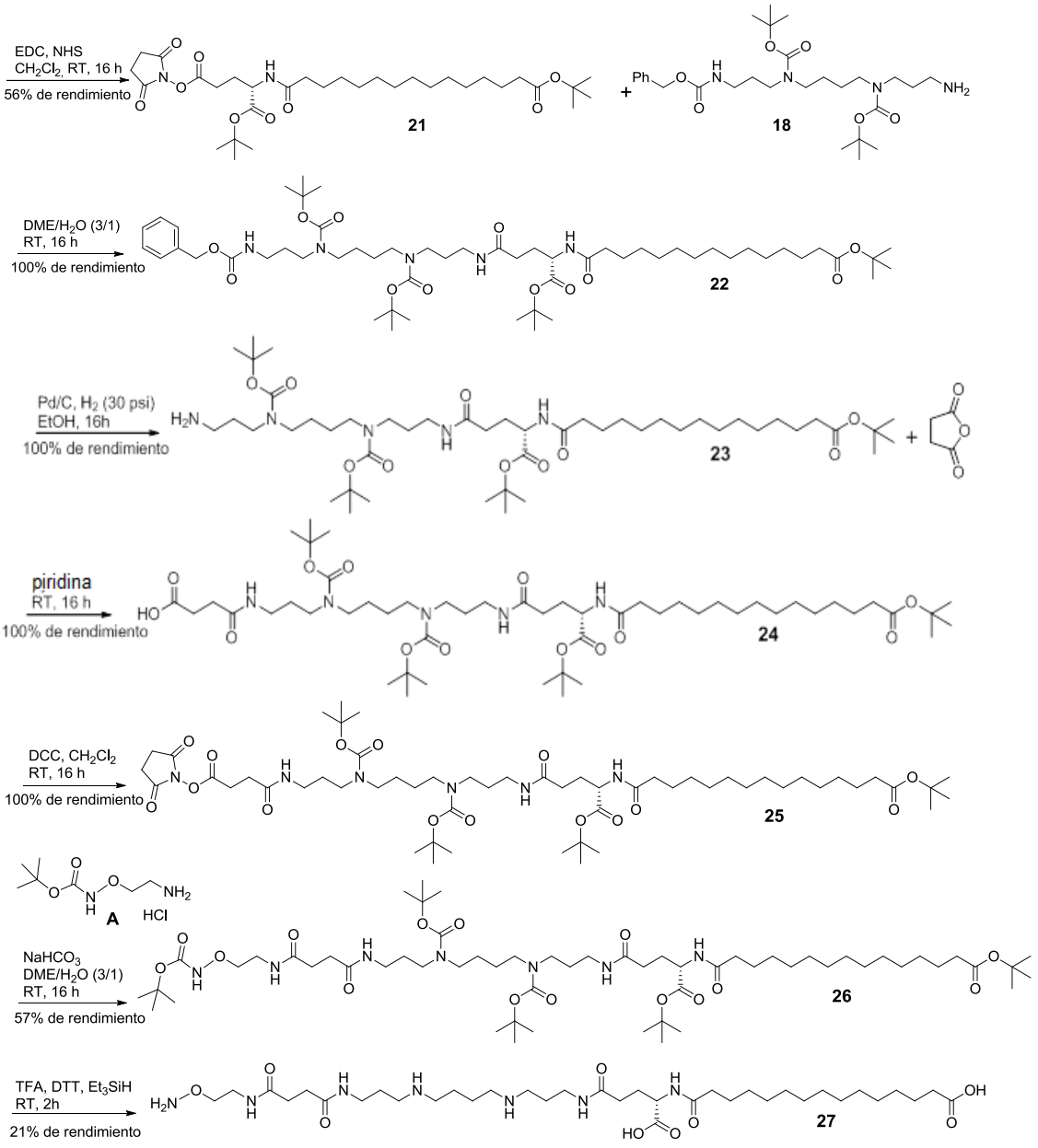
Compuesto 15. Se agregó agua (4 ml) a una mezcla agitada de compuesto **14** (908 mg, 0.403 mmol) y 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (**2**) (142 mg, 0.806 mmol) en DME (12 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se concentró, y el residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4Cl acuoso (columna: Teledyne Isco C18 Redi SepRf High performance Gold; detector: ELSD; velocidad: 60 ml/min; solvente A: 95 % de H_2O, 5 % de MeCN, 10 mM de NH_4OAc; solvente B: 5 % de H_2O, 95 % de MeCN, 10 mM de NH_4OAc). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **15** (730 mg, 78% de rendimiento) como un sólido

blanco. $(M+2H)^{2+}$ 1158, $(M+3H)^{3+}$ 772.

Compuesto 16. Se agregó TFA (2 ml, 104 mmol) a una mezcla agitada de compuesto **15** (420 mg, 0.181 mmol) y 1,4-dimetoxibenceno (201 mg, 1.451 mmol) en CH_8Cl_2 (8 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, se concentró, y el residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/NH_4Cl acuoso (monitoreado mediante ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título **16** (240 mg, 63% de rendimiento) como un sólido blanco. Se determinó que la pureza de UHPLC-ELSD era de 75.2% mediante la condición B del análisis de UHPLC-ELSD. $(M+2H)^{2+}$ 1052. $(M+3H)^{3+}$ 701.

Síntesis de reacción de espermina-Glu^{γ}-C_{14}-CO_2H (27)





(4-((3-aminopropil)(terc-butoxicarbonil)amino)butil)(3-(((benciloxi)carbonil)amino)propil)carbamato de Terc-butilo (18). Se agregó agua (100 ml) a una mezcla de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida (16.6 g, 66.4 mmol), butan-1,4-diilbis((3-aminopropil)carbamato) de di-terc-butilo (**17**)

(Strømgaard, K; Bjørnsdottir, I; Andersen, K; Brierley, M. J.; Rizoli, S.; Eldursi, N; Mellor, I,. R.; 4 Peter No.R. Usherwood, P. No. R.; Hansen, S. H.; Krogsgaard-Larsen, P.; Jaroszewski, J. W. *Chirality*, **2000**. *12*. 93) (19,1 g, 47,4 mmol) en THF (300 ml). Después de que se agitó a temperatura ambiente durante la noche, la totalidad del THF se retiró al vacío, y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (350 ml, 100 ml × 2) mientras la capa acuosa se saturaba con NaCI sólido. Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4, se filtraron, se concentraron al vacío y se purificaron mediante cromatografía instantánea, se eluyeron con NH_3 2 M-MeOH/CH_2Cl_2 (de 1:19 a 1:9) para proporcionar (4-((3-aminopropil)(terc-butoxicarbonil)amino)butil)(3-(((benciloxi)carbonil)amino)propil)carbamato de terc-butilo (**18**) (5.19 g, 9.67 mmol, 20.4 % de rendimiento). RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.22 - 7.40 (m, 5 H), 5.01 - 5.12 (m, 2 H), 3.34 - 3.48 (m, 4 H), 3.01 - 3.31 (m, 5 H), 2.65 (br t, *J*=6.60 Hz, 2 H), 1.86 - 2.19 (m, 4 H), 1.55 - 1.75 (m, 4 H), 1.43 - 1.50 (m, 4 H), 1.43 (s, 9 H), 1.42 (s, 9 H). El espectro de RMN-^{13}C era muy complejo debido a la presencia de rotámeros.

Pentadecandioato de 15-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-(terc-butil) (19). Una mezcla de ácido 15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanoico (compuesto 1 en el Ejemplo 4) (3.28 g, 10.0 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (1.73 g, 15.0 mmol)

y EDC (2.88 g, 15.0 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego se diluyó con CH_2Cl_2 (200 ml) y se lavó con salmuera/agua (1:1) dos veces, se secó en Na_2SO_4, se filtró, se concentró y se secó en alto vacío para proporcionar 1-terc-butil 15-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) pentadecandioato (**19**) (4.26 g, 10.0 mmol, 100 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa.

Ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanamido)-5-oxopentanoico (20) Una solución de $NaHCO_3$ (1.01 g, 12.0 mmol) en agua (30 ml) se agregó a una mezcla de ácido (S)-4-amino-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico (2.44 g, 12.0 mmol) y pentadecandioato de 15-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-terc-butilo (**19**) (4.26 g, 10.0 mmol) en DME (90 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, la totalidad del DME se retiró al vacío, el pH se ajustó a 2-3, y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (350 ml, 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4, se filtraron, se concentraron y se secaron en alto vacío para proporcionar ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanamido)-5-oxopentanoico (**20**) (5.14 g, 10.0 mmol, 100 % de rendimiento), que se usó directamente para la siguiente etapa.

(15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanoil)-L-glutamato de 5-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-(terc-butil) (21). Una mezcla de ácido (S)-5-(terc-butoxi)-4-(15-(terc-butoxi)-15-

oxopentadecanamido)-5-oxopentanoico (**20**) (5.14 g, 10.0 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (1.73 g, 15.0 mmol), EDC (2.88 g, 15,0 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego se diluyó con CH_2Cl_2 (200 ml) y se lavó con salmuera/agua (1:1) dos veces. La capa orgánica se secó en Na_2SO_4, se filtró, se concentró al vacío, y el residuo se sometió a cromatografía instantánea, se eluyó con EtOAc/CH_2Cl_2 para proporcionar 2-(15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanamido)pentandioato de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo (**21**) (3.41 g, 5.58 mmol, 55.8 % de rendimiento) (55.8% de rendimiento para 3 etapas) como un sólido blanco. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.20 (br d, *J*=7.82 Hz, 1 H), 4.62 (td, *J*=7.95, 4.89 Hz, 1 H), 2.80 - 2.91 (m, 4 H), 2.56 - 2.79 (m, 2 H), 2.29 - 2.42 (m, 1 H), 2.17 - 2.28 (m, 4 H), 2.02 - 2.16 (m, 1 H), 1.54 - 1.69 (m, 4 H), 1.48 - 1.53 (m, 9 H), 1.44 - 1.48 (m, 9 H), 1.21 - 1.39 (m, 18 H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.35, 173.33, 170.66, 168.95, 168.01. 82.82. 79.85, 51.66, 36.46, 35.66, 29.61. 29.49, 29.35, 29.31. 29.12. 28.15, 28.00. 27.62. 27.54. 25.60. 25.48, 25.15.

(S)-8,13,21-tris(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,8,13,17,22-pentaazaheptatriacontan-37-oato de terc-butilo (22). Se agregó agua (20 ml) a una mezcla de (4-((3-aminopropil)(terc-butoxicarbonil)amino)butil)(3-(((benciloxi)carbonil)amino)propil)carbamato de terc-butilo

(**18**) (1.42 g, 2.65 mmol), 2-(15-(terc-butoxi)-15-oxopentadecanamido)pentandioato de 5-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-1-terc-butilo (21) (1.62 g, 2.65 mmol) en DME (60 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, la totalidad de los componentes volátiles (incluso el agua) se retiraron en alto vacío, y el residuo se secó azeotrópicamente con MeOH (2 x). El residuo se disolvió en MeOH/CH_2Cl_2 (1:9, < 10 ml) y se sometió a cromatografía instantánea, que se eluyó con MeOH/CH_2Cl_2 para proporcionar 8,13,21-tris(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-1-fenil-2-oxa-4.8,13,17,22-pentaazaheptatriacontan-37-oato de (S)-terc-butil (**22**) (2.74 g, 2.65 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.29 - 7.39 (m, 5 H), 7.12 - 7.25 (m, 1 H), 6.69 - 6.89 (m, 1 H), 5.67 - 5.95 (m, 1 H), 5.03 - 5.15 (m, 2 H), 4.30 - 4.47 (m, 1 H), 3.38 - 3.54 (m, 8 H), 3.05 - 3.32 (m, 8 H), 2.12 - 2.35 (m, 6 H), 1.86 - 2.05 (m, 1 H), 1.51 - 1.76 (m, 7 H), 1.45 (s, 9 H), 1.44 (s, 27 H), 1.17 - 1.33 (m, 20 H). El espectro de RMN-^{13}C era muy complejo debido a la presencia de rotámeros.

(S)-5-(3-aminopropil)-10,18-bis(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,15,20-trioxo-3-oxa-5,10,14,19-tetraazatetratriacontan-34-oato de terc-butilo (23). Una mezcla de 8,13,21-tris(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,8,13,17,22-pentaazaheptatriacontan-37-oato de (S)-terc-butilo (**22**) (1.36 g, 1.32 mmol) y Pd-C (0.140 g,

10 % en peso) en etanol (100 ml) se hidrogenó en un agitador Parr (H_2, 30 psi (2.11 kgf/cm^2)) durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró, se lavó con EtOH, se concentró y se secó en alto vacío para proporcionar 5-(3-aminopropil)-10,18-bis(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,15,20-trioxo-3-oxa-5,10,14,19-tetraazatetratriacontan-34-oato de (S)-terc-butilo (**23**) (1.19 g, 1.32 mmol, 100 % de rendimiento), que se usó directamente para la siguiente etapa. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.91 - 7.09 (m, 1 H), 6.46 - 6.73 (m, 1 H), 4.34 - 4.54 (m, 1 H), 3.66 - 3.81 (m, 1 H), 3.10 - 3.36 (m, 10 H), 2.82 - 2.93 (m, 2 H), 2.58 - 2.67 (m, 3 H), 2.13 - 2.36 (m, 6 H), 1.55 - 1.72 (m, 6 H), 1.49 - 1.53 (m, 4 H), 1.48 (s, 9 H), 1.47 (d, *J*=3.18 Hz, 27 H), 1.22 - 1.37 (m, 20 H). El espectro de RMN-^{13}C era muy complejo debido a la presencia de rotámeros.

Ácido (S)-20,28,33-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,18,23,38-tetraoxo-3-oxa-19,24,28,33,37-pentaazahentetracontan-41-oico (24). Se agregó piridina (13 ml) a una mezcla de 5-(3-aminopropil)-10,18-bis(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,15,20-trioxo-3-oxa-5,10,14,19-tetraazatetratriacontan-34-oato de (S)-terc-butilo (**23**) (1.19 g, 1.32 mmol) y dihidrofuran-2,5-diona (0.66 g, 6.6 mmol). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, la totalidad de los componentes volátiles se retiraron al vacío, y el residuo se sometió a cromatografía

instantánea, se eluyó con MeOH/CH_2Cl_2 que contenía 0.5 % de AcOH para proporcionar ácido (S)-20,28,33-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,18,23,38-tetraoxo-3-oxa-19,24,28,33,37-pentaazahentetracontan-41-oico (**24**) (1.32 g, 1.32 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 4.38 - 4.50 (m, 1 H), 3.47 - 3.58 (m, 1 H), 3.09 - 3.32 (m, 9 H), 2.75 (s, 4 H), 2.64 - 2.73 (m, 2 H), 2.46 - 2.59 (m, 2 H), 2.27 - 2.35 (m, 2 H), 2.17 - 2.27 (m, 4 H), 2.07 - 2.14 (m, 4 H), 1.83 - 2.04 (m, 1 H), 1.67 - 1.80 (m, 3 H), 1.55 - 1.66 (m, 4 H), 1.41 - 1.54 (m, 38 H), 1.19 - 1.37 (m, 20 H).

(S)-8,13-bis(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-4,8,13,17,22-pentaazahexatriacontan-1,21,36-tricarboxilato de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de 21,36-di-terc-butilo (25). Se agregó DCC en CH_2Cl_2 (1.0 M, 2.0 ml, 2.0 mmol) a una mezcla de ácido (S)-20,28,33-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4.18,23,38-tetraoxo-3-oxa-19,24.28,33,37-pentaazahentetracontan-41-oico (**24**) (1.32 g, 1.32 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (0.23 g, 2.0 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, se filtró, se concentró y se secó en alto vacío para proporcionar (S)-8,13-bis(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-4,8,13,17,22-pentaazahexatriacontan-1,21,36-tricarboxilato de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de 21,36-di-terc-butilo (**25**) (1.45 g, 1.32 mmol, 100 % de rendimiento),

que se usó directamente para la siguiente etapa.

(S)-18,23,31-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,10,13,28,33-pentaoxo-3,6-dioxa-5,9,14,18,23,27,32-heptaazaheptatetracontan-47-oato de terc-butilo (26). Una solución de $NaHCO_3$ (0.233 g, 2.77 mmol) en agua (4 ml) se agregó a una mezcla de 8,13-bis(terc-butoxicarbonil)-3,18,23-trioxo-4,8,13,17,22-pentaazahexatriacontan-1,21,36-tricarboxilato de 1-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-21,36-di-terc-butilo (**25**) (1.45 g, 1.32 mmol) y clorhidrato de 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (0.561 g, 2.64 mmol) en DME (12 ml) a temperatura ambiente. Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, la totalidad de los componentes volátiles, incluso el agua, se retiraron al vacío, y el residuo se secó azeotrópicamente en THF. El residuo se sometió a cromatografía instantánea, se eluyó con $MeOH/CH_2Cl_2$ para proporcionar (S)-18,23,31-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,10,13,28,33-pentaoxo-3,6-dioxa-5,9,14.18,23,27,32-heptaazaheptatetracontan-47-oato de terc-butilo (**26**) (0.87 g, 0.75 mmol, 57 % de rendimiento) como un líquido viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4.33 - 4.48 (m, 1 H), 3.80 - 3.94 (m, 4 H), 3.42 - 3.55 (m, 14 H), 3.08 - 3.32 (m, 7 H), 2.68 - 2.77 (m, 4 H), 2.50 - 2.63 (m, 4 H), 2.13 - 2.34 (m, 4 H), 1.54 - 1.74 (m, 6 H), 1.43 - 1.53 (m, 45 H), 1.22 - 1.35 (m, 20 H). El espectro de RMN-^{13}C era muy complejo debido a la presencia de rotámeros.

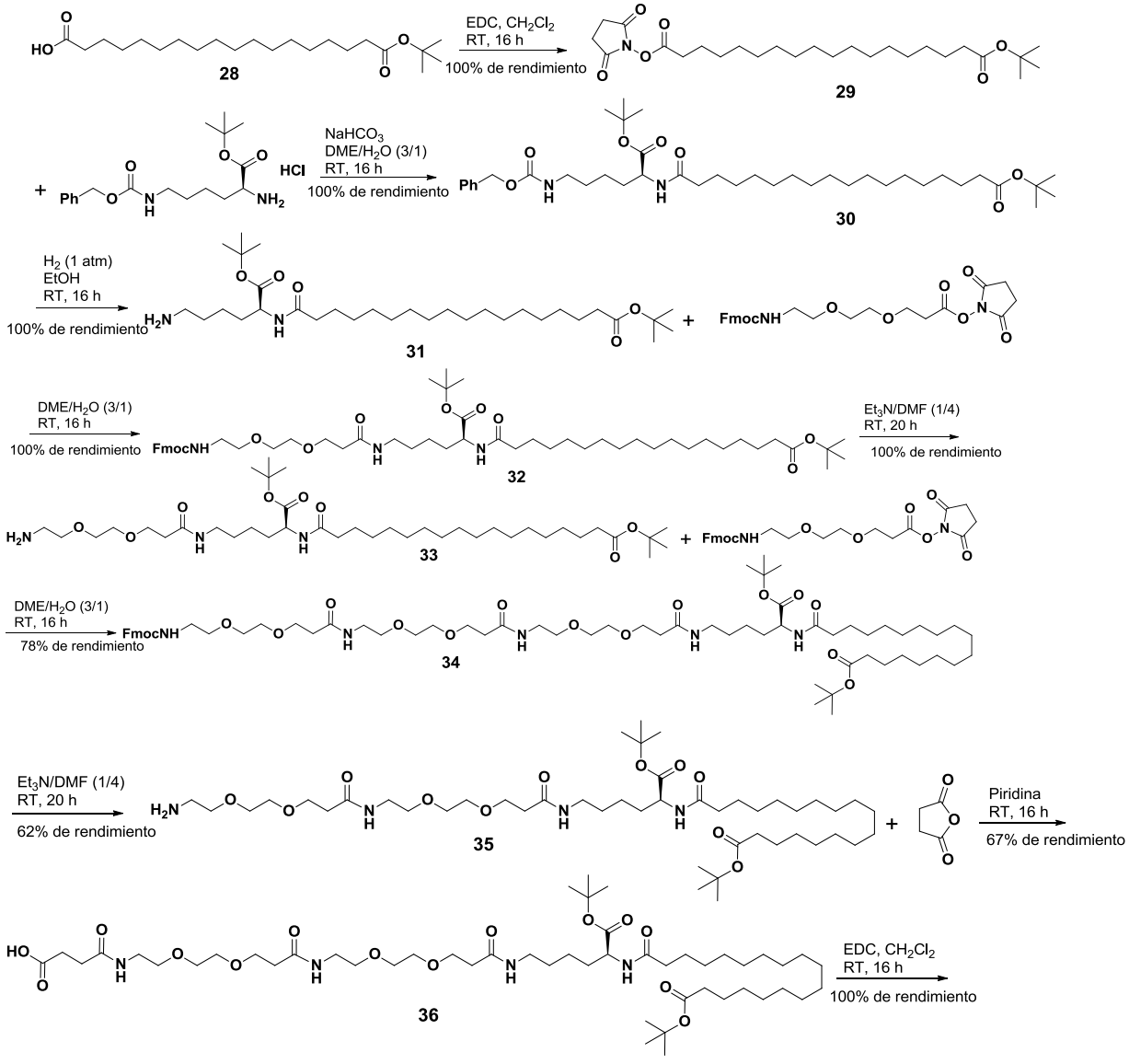
Ácido (S)-1-(aminooxi)-25-carboxi-4,7,22,27-tetraoxo-3,8,12,17,21,26-hexaazahentetracontan-41-oico (27). A una mezcla de 18,23,31-tris(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4.10.13,28,33-pentaoxo-3,6-dioxa-5,9,14.18,23,27,32-heptaazaheptatetracontan-47-oato de (S)-terc-butilo (**26**) (0.50 g, 0.43 mmol) y DTT (0.067 g, 0.43 mmol) en TFA (1.5 ml), se agregaron trietilsilano (0.10 ml, 0.63 mmol) y agua (0.10 ml, 5.6 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y luego la totalidad de los componentes volátiles se retiraron usando un flujo de N_2 durante la noche. El residuo se sometió a purificación mediante LC/MS preparativa usando las siguientes condiciones: Columna: Waters CSH C18, 19 x 200 mm, partículas de 5 µm; fase móvil A: 5:95 acetonitrilo:agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético; fase móvil B: 95:5 acetonitrilo:agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético; gradiente: 0-35% de B durante 25 minutos, luego un mantenimiento de 5 minutos a 100 % de B; flujo: 20 ml/miNo. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los componentes orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se enfrió hasta -78 °C en un flujo de nitrógeno y se liofilizó para proporcionar el compuesto del título (**27**) como un sólido blanco (72 mg, 21 % de rendimiento). Se determinó que la pureza de LC-CAD era de 94.9 % mediante la condición C

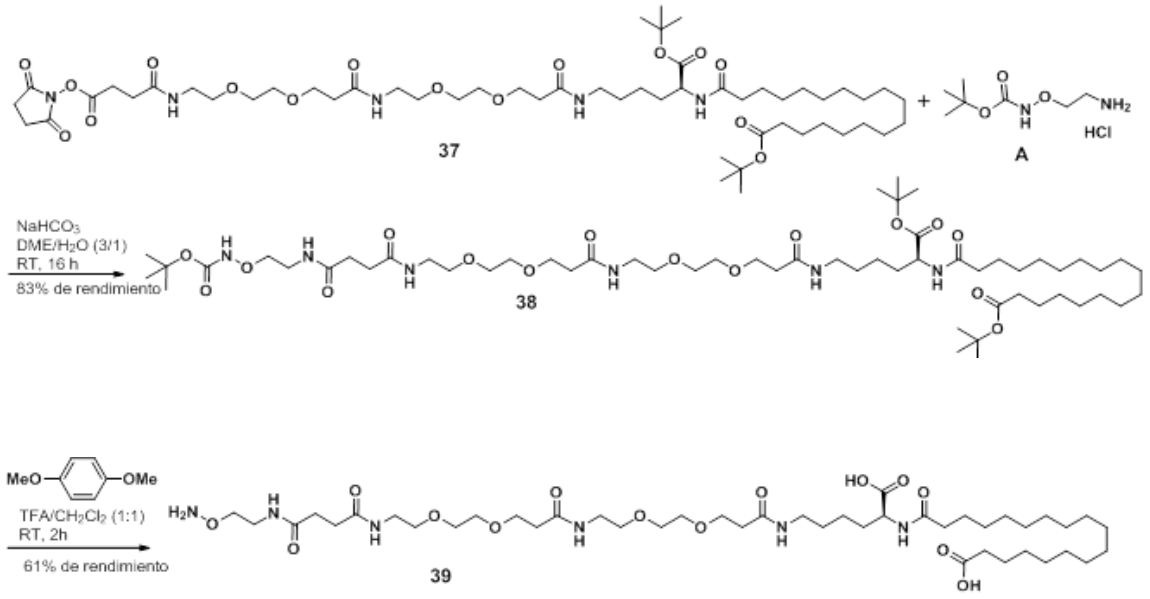
del análisis de UHPLC-CAD. $[MH]^+$ 745.09.

Condición A de análisis: Tiempo de retención = 1.27 min; ESI-MS $(MH)^+$ = 744.55.

Condición B de análisis: Tiempo de retención = 1.20 min; ESI-MS $(MH)^+$ = 744.40.

Síntesis de reacción del compuesto 39:





octadecandioato de 18-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-(terc-butil) (29). Se agregó EDC (1.406 g, 7,33 mmol) a una mezcla de ácido 18-(terc-butoxi)-18-oxooctadecanoico (**28**) (se preparó con un método similar al que se usó para preparar el Compuesto **1** en el Ejemplo 4) (2.09 g, 5.64 mmol) y 1-hidroxipirrolidin-2.5-diona (0.844 g, 7.33 mmol) en CH_2Cl_2 (40 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se diluyó con CH_2Cl_2 (100 ml) y se lavó con $NaHCO_3$. Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (80 ml × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en Na_2SO_4. se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se sometió a cromatografía instantánea, se eluyó con CH_2Cl_2 para proporcionar octadecandioato de 18-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-terc-butilo (**29**) (2.13 g, 4.55 mmol, 81 % de rendimiento) como un sólido blanco. RMN-^{1}H

(400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.85 (br s, 4H), 2.62 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.22 (t, *J*=7.6 Hz, 2H), 1.77 (quin, *J*=7.5 Hz, 2H), 1.67 - 1.54 (m, 3H), 1.50 - 1.37 (m, 10H), 1.37 - 1.21 (m, 22H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.33, 169.12.168.67, 79.85, 35.67, 30.98, 29.65 (br s), 29.62 (br s), 25.61. 29.55, 29.50. 29.36, 29.31. 29.12. 29.09, 28.81. 28.15, 25.15, 24.60.

(S)-18-((6-(((benciloxi)carbonil)amino)-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de terc-butilo (30). Se agregó $NaHCO_3$ (0.41 g, 4.83 mmol) a una mezcla de octadecandioato de 18-(2.5-dioxopirrolidin-1-il) de 1-terc-butilo (**29**) (1.13 g, 2.416 mmol) y clorhidrato de Lys(N^{ε}-CBZ)-O^{t}Bu (1.17 g, 3,14 mmol) en DME (60 ml) y agua (20 ml). La suspensión liviana resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El DME se retiró al vacío, y luego se agregó HCl acuoso (1 M, 4.83 ml, 4.83 mmol) para ajustar el pH a 2-3. La mezcla se extrajo con EtOAc (200 ml, 100 ml × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en Na_2SO_4, se filtraron, se concentraron al vacío y se sometieron a cromatografía instantánea, se eluyeron con EtOAc/CH_2Cl_2 para proporcionar 18-((6-(((benciloxi)carbonil)amino)-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de (S)-terc-butil (**30**) (1.66 g, 2.42 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido incoloro viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.29 - 7.38 (m, 5 H),

6.08 (br d, *J*=7.34 Hz, 1 H), 5.06 - 5.19 (m, 2 H), 4.84 - 5.02 (m, 1 H), 4.48 (td, *J*=7.70. 5.14 Hz, 1 H), 3.07 - 3.27 (m, 2 H), 2.15 - 2.24 (m, 4 H), 1.75 – 1.88 (m, 1H), 1.49 - 1.70 (m, 7 H), 1.46 (s, 9 H), 1.44 (s, 9 H), 1.20 - 1.34 (m, 26 H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.30. 172.87, 171.81. 171.05, 156.49, 136.67, 128.47, 128.03, 82.03, 79.82. 66.55, 60.35, 52.24. 40.66, 36.65, 35.64. 32.35, 29.67, 29.64. 29.61. 29.50. 29.48, 29.44. 29.33, 29.29, 29.10. 28.13, 28.00. 25.63, 25.13, 22.25, 21.00. 14.19. $[MH]^+$ 689.62.

(S)-18-((6-amino-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de Terc-butilo (31). Una mezcla de 18-((6-(((benciloxi)carbonil)amino)-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de (S)-terc-butilo (**30**) (1.060 g, 1.2 mmol) y Pd-C (0.128 g, 1.200 mmol) en EtOH (50 ml) se hidrogenó (globo) durante la noche a temperatura ambiente. Luego de varios ciclos de purga con nitrógeno al vacío, la mezcla de reacción se filtró cuidadosamente y se lavó con EtOH. El filtrado se concentró y se secó en alto vacío para proporcionar (**31**) 18-((6-amino-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de (S)-terc-butilo (0.67 g, 1.2 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido incoloro, que se utilizó directamente en la siguiente etapa. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.40 - 6.59 (m, 1 H), 4.30 - 4.50 (m, 1 H), 3.16 - 3.37 (m, 2 H), 2.65 - 2.81 (m, 2 H), 2.10 - 2.25 (m, 4 H), 1.72 - 1.84 (m, 1 H), 1.47 - 1.67 (m, 7

H), 1.43 (s, 9 H), 1.41 (s, 9 H), 1.22 - 1.36 (m, 26 H). RMN-^{13}C ($CDCl_3$) δ ppm 173.53, 173.48, 171.90. 82.10. 79.95, 52.47, 50.19, 40.80. 36.50. 35.62. 32.11. 30.66, 29.63, 29.60. 29.56, 29.48, 29.44. 29.33, 29.25, 29.05, 28.07, 27.94. 25.66, 25.09, 22.41. $[MH]^+$ 555.63.

(S)-19-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,21-trioxo-2,7,10-trioxa-4,14,20-triazaoctatriacontan-38-oato de Terc-butilo (32). Se agregó $NaHCO_3$ (0.202 g, 2.40 mmol) a una mezcla de 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azatridecan-13-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (0.715 g, 1.44 mmol), 18-((6-amino-1-(terc-butoxi)-1-oxohexan-2-il)amino)-18-oxooctadecanoato de (S)-terc-butilo (**31**) (0.67 g, 1.2 mmol) en DME (15 ml) y agua (5). Luego de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la totalidad de los componentes volátiles se retiraron al vacío, y el residuo se sometió a cromatografía instantánea, se eluyó con EtOAc/CH_2Cl_2 para proporcionar 19-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,21-trioxo-2,7,10-trioxa-4,14,20-triazaoctatriacontan-38-oato de (S)-terc-butil (**32**) (1.12 g, 1.20 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido incoloro viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.78 (d, *J*=7.58 Hz, 2 H), 7.63 (d, *J*=7.34 Hz, 2 H), 7.37 - 7.47 (m, 2 H), 7.30 - 7.36 (m, 2 H), 6.21 - 6.37 (m, 1 H), 6.00 - 6.17 (m, 1 H), 5.43 - 5.63 (m, 1 H), 4.40 - 4.54 (m, 3 H), 4.19 - 4.33 (m, 1 H), 3.75 (t, *J*=5.87 Hz, 2 H), 3.53 - 3.68 (m, 6 H), 3.42 (br

d, *J*=4.89 Hz, 2 H), 3.22 (q, *J*=6.28 Hz, 2 H), 2.44 (br t, *J*=5.38 Hz, 2 H), 2.22 (t, *J*=7.58 Hz, 4 H), 1.75 - 1.89 (m, 1 H), 1.55 - 1.69 (m, 7 H), 1.47 (s, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 1.20 - 1.35 (m, 26 H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.34. 173.01. 171.82. 171.38, 156.56, 143.99, 141.34. 127.70. 127.05, 125.06, 119.98, 82.07, 79.87, 70.25, 70.12. 70.05, 67.29, 66.63, 52.27, 47.33, 40.86, 38.99, 37.03, 36.67, 35.67, 32.45, 29.70. 29.67, 29.64. 29.63, 29.53, 29.51. 29.38, 29.33, 29.13, 29.03, 28.15, 28.04. 25.68, 25.16, 22.47. $[MH]^+$ 936.80.

(S)-1-amino-15-(terc-butoxicarbonil)-9,17-dioxo-3,6-dioxa-10,16-diazatetratriacontan-34-oato de terc-butilo (33). Se agregó Et_3N (2.5 ml, 18 mmol) a una mezcla de 19-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,21-trioxo-2,7,10-trioxa-4,14,20-triazaoctatriacontan-38-oato de (S)-terc-butilo (**32**) (1.12 g, 1.20 mmol) en DMF (10 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se agregó más Et_3N (1.0 ml, 7.2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 h más. La totalidad de los componentes volátiles se retiraron al vacío, y el residuo se secó en alto vacío para proporcionar 1-amino-15-(terc-butoxicarbonil)-9,17-dioxo-3,6-dioxa-10.16-diazatetratriacontan-34-oato de (S)-terc-butilo (**33**) (0.857 g, 1.20 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido incoloro, que se utilizó directamente en la siguiente etapa. $[MH]^+$

714.70.

(S)-39-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,23,33,41-pentaoxo-2,7,10,17,20,27,30-heptaoxa-4,14,24,34,40-pentaazaoctapentacontan-58-oato de terc-butilo (34). Se agregó $NaHCO_3$ (0.20 g, 2.4 mmol) a una mezcla de 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azatridecan-13-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (0.715 g, 1.44 mmol), 1-amino-15-(terc-butoxicarbonil)-9,17-dioxo-3,6-dioxa-10.16-diazatetratriacontan-34-oato de (S)-terc-butilo (**33**) (0.857 g, 1.20 mmol) en DME (15 ml) y agua (5 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, la totalidad de los componentes volátiles se retiraron al vacío, y se agregó HCl acuoso (1 M, 2.4 ml, 2.4 mmol) para ajustar el pH a 2-3. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (200 ml, 100 ml × 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron en Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se sometió a cromatografía instantánea (gel de sílice), se eluyó con $MeOH/CH_2Cl_2$ para proporcionar 29-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,23,31-tetraoxo-2,7,10,1720-pentaoxa-4,14,24,30-tetraazaoctatetracontan-48-oato de (S)-terc-butilo (**34**) (1.03 g, 0.940 mmol, 78 % de rendimiento) como un líquido incoloro viscoso. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.78 (d, *J*=7.58 Hz, 2 H), 7.63 (br d, *J*=7.34 Hz, 2 H), 7.39 - 7.46 (m, 2 H), 7.30 - 7.36 (m, 2 H), 6.74 (br s, 1 H), 6.27 - 6.39 (m, 1 H), 6.05 -

6.24 (m, 1 H), 5.60 - 5.78 (m, 1 H), 5.19 - 5.40 (m, 3 H), 4.38 - 4.55 (m, 3 H), 4.17 - 4.32 (m, 1 H), 3.74 - 3.79 (m, 2 H), 3.72 (t, *J*=5.99 Hz, 2 H), 3.61 - 3.67 (m, 4 H), 3.54 - 3.61 (m, 8 H), 3.48 - 3.54 (m, 6 H), 3.37 - 3.47 (m, 4 H), 3.17 - 3.29 (m, 2 H), 2.49 (br t, *J*=5.87 Hz, 2 H), 2.43 (t, *J*=5.87 Hz, 2 H), 2.18 - 2.26 (m, 4 H), 1.76 - 1.90 (m, 1 H), 1.51 - 1.73 (m, 7 H), 1.48 (s, 9 H), 1.46 (s, 9 H), 1.18 - 1.37 (m, 26 H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.34. 173.04. 171.80. 171.43, 171.34. 156.62. 144.00. 141.35, 127.69, 127.05, 125.04. 119.97, 82.05, 79.87, 77.55, 70.22. 70.18, 70.16, 70.07, 69.92. 67.23, 66.51. 53.40. 52.29, 50.86, 47.34. 40.99, 39.18, 39.04. 37.04. 36.95, 36.67, 35.67, 32.42. 29.70 (br s), 29.68 (br s), 29.65 (br s), 29.63 (br s), 29.54. 29.51. 29.38, 29.34. 29.32. 29.12. 29.01. 28.15, 28.0. 25.68, 25.16, 22.51. $[MH]^+$ 1254.90.

(S)-1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-9,19,27-trioxo-3,6,13,16-tetraoxa-10,20,26-triazatetratetracontan-44-oato de terc-butilo (35). Se agregó Et_3N (1.2 ml, 8.61 mmol) a una mezcla de 29-(terc-butoxicarbonil)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,13,23,31-tetraoxo-2,7,10,17,20-pentaoxa-4,14,24,30-tetraazaoctatetracontan-48-oato de (S)-terc-butilo (**34**) (330 mg, 0.301 mmol) en DMF (3 ml). Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, la totalidad de los componentes volátiles se retiraron en alto vacío. El residuo se sometió a cromatografía instantánea, se eluyó con

NH_3-MeOH/CH_2Cl_2 2 M (1:9), para proporcionar 1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-9,19,27-trioxo-3,6,13,16-tetraoxa-10,20,26-triazatetratetracontan-44-oato de (S)-terc-butilo (**35**) (164 mg, 0.188 mmol, 62.3 % de rendimiento) como un líquido incoloro. RMN-^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 6.78 - 6.92 (m, 1 H), 6.48 - 6.62 (m, 1 H), 6.15 - 6.35 (m, 1 H), 4.35 - 4.53 (m, 1 H), 3.75 (q, *J*=6.11 Hz, 4 H), 3.59 - 3.68 (m, 8 H), 3.54 - 3.59 (m, 2 H), 3.49 - 3.54 (m, 2 H), 3.40 - 3.48 (m, 3 H), 3.16 - 3.29 (m, 2 H), 2.80 - 2.92 (m, 2 H), 2.38 - 2.57 (m, 4 H), 2.12 - 2.32 (m, 4 H), 1.75 - 1.87 (m, 1 H), 1.49 - 1.75 (m, 8 H), 1.47 (s, 9 H), 1.45 (s, 9 H), 1.20 - 1.38 (m, 26 H). RMN-^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 173.32. 173.04. 171.80. 171.47, 171.37, 81.99, 79.85, 74.86, 73.34. 70.30. 70.23, 70.12. 70.08, 69.88, 67.30. 52.31. 50.60. 41.74. 39.18, 39.00. 37.05, 37.00. 36.64. 35.65, 32.35, 29.67, 29.66, 29.61. 29.52. 29.48, 29.33, 29.31. 29.31. 29.11. 29.04. 28.13, 28.03, 25.68, 25.13, 22.51. $[MH]^+$ 873.75.

Ácido (S)-23-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,21,29,39,49-pentaoxo-3,32,35,42,45-pentaoxa-22,28,38,48-tetraazadopentacontan-52-oico (36). Se agregó piridina (5.0 ml) a una mezcla de 1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-9,19,27-trioxo-3,6,13,16-tetraoxa-10,20,26-triazatetratetracontan-44-oato (**35**) (164 mg, 0.188 mmol) y dihidrofuran-2,5-diona de (S)-terc-butilo (94 mg, 0.939 mmol) a temperatura ambiente. Después de que la mezcla se agitó a temperatura ambiente

durante la noche, la totalidad de los componentes volátiles se retiraron en alto vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/TFA acuoso (monitoreado por ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los componentes orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título ácido (S)-23-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,21,29,39,49-pentaoxo-3,32,35,42,45-pentaoxa-22.28,38,48-tetraazadopentacontan-52-oico (**36**) (123 mg, 0.126 mmol, 67.3 % de rendimiento) como un líquido incoloro. $[MH]^+$ 973.81.

(S)-3,13,23,31-tetraoxo-7,10,1720-tetraoxa-4,14,24,30-tetraazaheptatetracontan-1,29,47-tricarboxilato de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de 29,47-di-terc-butil (37). A una mezcla de ácido (S)-23-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,21,29,39,49-pentaoxo-3,32,35,42,45-pentaoxa-22,28,38,48-tetraazadopentacontan-52-oico (**36**) (123 mg, 0.126 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (21.8 mg, 0.190 mmol) y EDC (31.5 mg, 0.164 mmol), se agregó CH_2Cl_2 (5 ml). Después de agitar la solución transparente resultante a temperatura ambiente durante la noche, LC/ELSD-MS mostró aproximadamente 70 % de conversióNo. Se agregó más 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (21.8 mg, 0.190 mmol) y EDC (31.5 mg, 0.164 mmol), y la

mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h. LC/ELSD-MS mostró una conversión completa. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (150 ml) y se lavó con agua/salmuera (2:1), se secó en Na_2SO_4. se filtró, se concentró en alto vacío para proporcionar 3,13,23,31-tetraoxo-7,10,1720-tetraoxa-4,14,24,30-tetraazaheptatetracontan-1,29,47-tricarboxilato de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de (S)-29,47-di-terc-butilo (**37**) (135 mg, 0.126 mmol, 100 % de rendimiento) como un líquido incoloro, que se utilizó directamente en la siguiente etapa. $[MH]^+$ 1070.93.

(S)-39-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,10,13,23,33,41-hexaoxo-3,6,17,20,27,30-hexaoxa-5,9,14,24,34.40-hexaazaoctapentacontan-58-oato de Terc-butilo (38). Se agregó $NaHCO_3$ (21.2 mg, 0.252 mmol) a una mezcla de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) 3,13,23,31-tetraoxo-7,10,17,20-tetraoxa-4,14,24,30-tetraazaheptatetracontan-1,29,47-tricarboxilato de (S)-29,47-di-terc-butilo (**37**) (135 mg, 0.126 mmol) y clorhidrato de 2-aminoetoxicarbamato de terc-butilo (53.6 mg, 0.252 mmol) en DME (4.5 ml) y agua (1.5 ml). La solución transparente resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La totalidad de los componentes volátiles se retiraron al vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/TFA acuoso (monitoreado por ELSD-MS). Las fracciones que contenían el

producto deseado se combinaron, y los componentes orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se liofilizó para proporcionar el compuesto del título 39-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,10,13,23,33,41-hexaoxo-3,6,17,20,27,30-hexaoxa-5,9,14,24,34,40-hexaazaoctapentacontan-58-oato de (S)-terc-butilo (**38**) (118 mg, 0.104 mmol, 83,0 % de rendimiento). $[MH]^+$ 1131.99.

Ácido (S)-1-(aminooxi)-33-carboxi-4,7,17,27,35-pentaoxo-11,14,21,24-tetraoxa-3,8,18,28,34-pentaazadopentacontan-52-oico (39). Se agregó TFA (2 ml) a 0 °C a una mezcla de 39-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4,10,13,23,33,41-hexaoxo-3,6,17,20,27,30-hexaoxa-5,9,14,24,34,40-hexaazaoctapentacontan-58-oato de (S)-terc-butilo (**38**) (118 mg, 0.104 mmol) y 1.4-dimetoxibenceno (144 mg, 1.043 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml). La mezcla se agitó a 0 °C durante 5 min, y luego a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró, y luego se secó en alto vacío durante 30 miNo. El residuo se purificó mediante cromatografía de fase inversa de presión media en una columna C-18, que se eluyó con MeCN/TFA acuoso (monitoreado por ELSD-MS). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, y los compuestos orgánicos volátiles se retiraron utilizando un flujo de nitrógeno. La solución acuosa resultante que contenía el producto deseado se enfrió hasta -78 °C en un

flujo de nitrógeno y se liofilizó para proporcionar ácido **(**S)-1-(aminooxi)-33-carboxi-4,7,17,27,35-pentaoxo-11,14,21,24-tetraoxa-3,8,18,28,34-pentaazadopentacontan-52-oico (**39**) (60.0 mg, 0.064 mmol, 61.3 % de rendimiento) como un sólido blanco. Se determinó que la pureza de LC-CAD era de 98.0 % mediante la condición D del análisis de UHPLC-CAD. $[MH]^+$ 919.88, $[M+2H]^+/2$ 460.69.

Ejemplo 7: Ensayo de acumulación de cAMP intracelular

Los efectos de la relaxina H2 están mediados *por* su receptor cognado acoplado a proteínas G, receptor del péptido de la familia de relaxina (RXFP1), lo que permite la estimulación de una combinación de mediantes de transducción de señal celular que dependen del tipo de célula y pueden incluir adenilato ciclasa, proteína quinasa A, proteína quinasa C, fosfatidilinositol 3-quinasa y quinasa regulada por la señal extracelular (Erk1/2). Bathgate, et al., 2006. *Pharmacol. Rev.* **58**, 7–31. El ensayo de acumulación de cAMP intracelular descrito en la presente se utilizó para evaluar la bioactividad y potencia de la relaxina. Los compuestos de prueba se basaron en WT-RLX (Figura 1), AQ1 (Figura 2) y BM25/AN1 (Figura 3). Los prolongadores PK, como se mostró, se conjugaron con la para-acetil-fenilalanina contenida en AQ1 y BM25/AN1 mediante un enlace oxima como se describió en el Ejemplo 3.

Las células CHO-K1 (ATCC; Cat. No.° CRL-9618) que expresaban de manera estable el receptor RXFP1 humano (locus No.° LOC59350) (10.000/cavidad) se colocaron en placas de 96 cavidades y se cultivaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO_2. Al día siguiente, el medio se retiró de las cavidades, y las células se estimularon con la adición de ligando (polipéptido de relaxina) en 50 ul de amortiguador (1 X HBSS, 5 mM de HEPES (7,2), 0.5 mM de IBMX, 0.1 % de BSA); la incubación duró 10 min a 37 °C. Las células no estimuladas se usaron como controles de referencia. Las reacciones se detuvieron, y se midieron los niveles de cAMP celular usando un kit de cAMP de fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF) Dynamic 2 (CisBio, #62AM4PEC) de conformidad con el protocolo del fabricante. Se analizaron las placas usando un lector multidetector EnVision 2104 (PerkinElmer). La señal se expresó en términos de la relación de intensidad de fluorescencia a 665 nm/intensidad de fluorescencia a 620 nm x 10.000. La concentración de cAMP en la muestra se determinó mediante la comparación con curvas estándares generadas de concentraciones conocidas de cAMP. La potencia de cada relaxina se determinó usando curvas de respuesta a la concentración de 10 puntos, que se realizaron en duplicado. Los datos se analizaron con un *software* Microsoft Excel, versión 2013 Xlfit. Los valores de concentración efectiva 50 (EC50), el punto en el que la respuesta era la mitad de la

máxima, se calcularon usando una ecuación logística de 4 parámetros que permitió una pendiente variable (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del ensayo de acumulación de cAMP intracelular Abreviaturas usadas en esta tabla: dK: D-lisina; Sar: sarcosina (N-metilglicina); dGlu: Ácido D-glutámico; PEG de 20 kDa: poli(etilenglicol), peso molecular 20 kDa; PEGn (por ejemplo, n es 2. 12. 24 o 36): $-(O-CH_2-CH_2)_n-O-$; -C13-: $-(C=O)-(CH_2)_{12}-$; -C14-: $-(C=O)-(CH_2)_{13}-$; -C15-: $-(C=O)-(CH_2)_{14}-$ (estas abreviaturas son ilustrativas de, pero no limitan, -Cn- de la Fórmula I o los usos de estos términos fuera de esta tabla). En Glu^{γ}-C13-, Glu^{γ}-C14-, Glu^{γ}-C15- y Glu^{γ}-C17- en la Tabla 3, el primer carbono carbonilo del ácido graso está unido a un residuo Glu (gama) mediante un enlace amida.

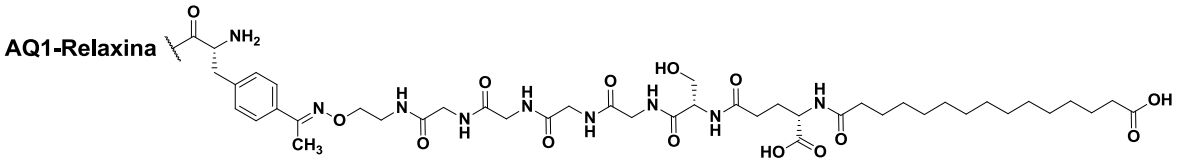
Nombre del conjugado de relaxina	EC50 de cAMP hRXFP1/CHO-K1 (nM, prom.)	Componente peptídico SEQ ID NO:
WT-RLX	0.12	
BM25/AN1	0.09	
BM25/AN1-C13-CH3	1.85	
AQ1	0.11	
AQ1-PEG de 20 kDa	3.22	
AQ1-Glu-C13-CH3	0.95	
AQ1-Glu-C13-COOH	0.18	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	0.15	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	0.25	

AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.14	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	0.32	102
AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.08	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.29	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.22	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.31	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.09	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.65	108
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.19	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.28	110
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.39	111
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.32	112
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.59	113
AQ1-KKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.34	114
AQ1-KKSGGSGG-Glu$^{\alpha}$-C13-COOH	0.27	115
AQ1-KKSAGSAG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.27	116
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.24	117
AQ1-KKKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.14	118
AQ1-KKSGGSGGEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.16	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.10	120
AQ1-EESGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.83	121
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.55	122
AQ1-GSGSGSGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	2.79	123
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	5.26	124
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C17-COOH	10.52	125

AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	0.38	126
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	0.46	127
AQ1-EEEGGG-dGlu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.91	128
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.88	129
AQ1-EGGGGSK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.31	130
AQ1-EEEEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	11.06	131
Compuesto AQ1 39	2.23	
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.33	133
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	0.34	134
AQ1-EEEEPEEEEPEEEEPEEGGG-C14-CH3	0.16	135
AQ1-EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Gluγ-C14-CH3	0.67	136
AQ1-KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.81	137
AQ1- EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	4.96	138
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH[a]	0.28	139
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.10	140
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.34	141
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	0.40	142
AQ1-EEEEEE-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.38	143
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-CH3	0.35	144
AQ1-KGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.27	145
AQ1-KGPKGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.23	146
AQ1-SGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.32	147
AQ1-KGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.34	148
AQ1-KGGGSE-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.37	149

AQ1-GSPGSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.29	150
AQ1-GGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.39	151
AQ1-EGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.33	152
AQ1-EGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.44	153
AQ1-KGPGSE-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.60	154
AQ1-espermina-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	0.39	
AQ1-KKGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.36	156

[a] conjugado de relaxina AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-L-fenilalanina modificada ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina se liga al mejorador PK que comprende GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, como se ilustra en la Fórmula III



(Fórmula III).

Ejemplo 8: Estudios farmacocinéticos (PK) *in vivo*

Las ratas Sprague-Dawley macho (n=3) recibieron una dosis única intravenosa (IV) o subcutánea (SC) (1 mg/kg) de constructos de relaxina (como se describe en el Ejemplo 7 anterior) formulados en un amortiguador adecuado (por

ejemplo, 20 mM de histidina, 750 mM de NaCl, pH 6.0). Las muestras de sangre se recolectaron mediante vena yugular en momentos diferentes en 72 horas. Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente (30 - 60 min) y luego se centrifugaron (1500 - 2000) a 4 °C para proporcionar suero. Luego de la centrifugación, las muestras de suero se transfirieron a placas de 96 cavidades y se almacenaron a -80 °C hasta el bioanálisis. Las concentraciones de relaxina se midieron del suero mediante ELISA:

Los perfiles concentración-tiempo de relaxina de los animales individuales se usaron para el análisis. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante métodos no compartimentales usando Phoenix WinNonlin (versión 6.4) o Kinetica (versión 5). Se informaron los parámetros farmacocinéticos medios C_{max}, AUC_{inf}, C_{24} y la semivida (Tabla 4).

Tabla 4. Datos PK *in vivo* (abreviaturas de la Tabla 3).

Nombre del conjugado de relaxina	PK de rata Dosis SC (mg/kg)	PK de rata AUC total h*nmol/l	PK de rata C24 (nM)	SEQ ID NO: de componente peptídico
AQ1-PEG de 20 kDa	1.0[a]	1475	39	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	1.0	1003	9.7	
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	0.8	1096	1.52	101

AQ1-DRDDRD-C13-COOH	1.0	1008	0.38	102
AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	38	0.05	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	987	0.10	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	866	0.18	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	1381	0.29	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	258	0.24	107
AQ1-GETGSSGEGT-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	1112	0.28	108
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	231	0.10	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	582.0	0.46	110
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	814	0.73	117
AQ1-KKKSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	264	0.21	118
AQ1-KKSGGSGGEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	676	0.09	119
AQ1-dKdKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	1.0	31.2	0.06	120
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0[b]	5526	44	122
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0	3553	22	124
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	1.0	274	0.4	126
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	1.0	370	0.89	127
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0[c]	2137	5.2	129
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	2308	17	139
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	451	1.5	141
AQ1-KK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	1.0	820	8.8	142
AQ1-GSPGSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	1979	5	150
AQ1-GGGGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	1.0	2179	3.9	151

[a] ajustado de 0.2 mpk

[b] ajustado de 0.3 mpk

[c] ajustado de 0.5 mpk

Ejemplo 9: Estudios de flujo sanguíneo renal de rata

Las ratas Sprague-Dawley macho (~250 - 300 g) se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg), se colocó una cánula en la tráquea con un tubo PE-205 para mantener la permeabilidad de la mediante respiratoria, y la temperatura se mantuvo a 37 °C con una placa quirúrgica calentada. Un catéter de presión 1.4F (Millar Inc., Houston, TX) se pasó por la arteria carótida derecha para medir la presión sanguínea aórtica. Se colocó una cánula en la vena yugular derecha con un tubo PE50 para la administración de artículos de prueba. El riñón izquierdo se expuso mediante una incisión retroperitoneal, y una sonda de flujo Doppler (modelo 0.5 VB, Transonic System Inc., Ithaca, NY) se colocó en la arteria renal izquierda para monitorear el flujo sanguíneo. El sodio pentobarbital (15 mg/kg, intraperitoneal) se enriqueció luego de que finalizaron los procedimientos quirúrgicos. Luego de 10-15 min de estabilización, la relaxina se administró a 1 mg/kg por mediante intravenosa en un volumen de dosis de 0.15 a 1.82 ml/kg en un lapso de 30 segundos mediante una bomba de infusión (Harvard Apparatus, Holliston, MA). La presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y el flujo sanguíneo renal se registraron continuamente durante 45 min después de la administración de la relaxina usando una unidad Millar MPVS Ultra Signal Conditioning conectada a una computadora de

escritorio que funcionaba con un *software* de adquisición de datos LabChart 7-Pro (ADInstruments, Dunedin, Nueva Zelanda) (Tabla 5).

Tabla 5. Cambios en el flujo sanguíneo renal de la rata (abreviaturas de la Tabla 3).

Conjugado de relaxina	% de cambio en RBF sobre el valor inicial	SEQ ID NO: DEL COMPONENTE PEPTÍDICO
WT-RLX	+25	
AQ1-PEG de 20 kDa	+21	
BM25/AN1	-20	
BM25/AN1-C13-CH3	-100[a]	
BM25/AN1- PEG36-C13-CH3	-90	
BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3	-25	
AQ1	-17	
AQ1-Glu-C13-CH3	-27[b]	
AQ1-Glu-C13-COOH	+14[b]	
AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3	+20[b]	
AQ1-PEG36-C13-COOH	+22	
AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH	+24	
AQ1-PEG36-Glu-C15-COOH	+30	
AQ1-PEG24-Glu-C13-COOH	+15	
AQ1-PEG12-Glu-C13-COOH	+5	
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+2	101
AQ1-DRDDRD-C13-COOH	+11	102

AQ1-KKKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+12	103
AQ1-RGGEEKKKEKEK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+19	104
AQ1-GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+11	105
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+7[b]	106
AQ1-KKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+10[b]	107
AQ1-GGGKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+9	109
AQ1-GSHHHHHGS-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+16	110
AQ1-Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+6	157
AQ1-Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+5	158
AQ1-KSGGSGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	+17	117
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	+1	126
AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3	+18	127
AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	+10	139

[a] Los animales murieron al poco tiempo de la administración del compuesto. La necropsia mostró coloración pálida en los pulmones, lo que indica una pérdida completa del flujo sanguíneo.

[b] Se observó que los compuestos eran escasamente solubles.

Los resultados se tabularon para ilustrar la relación compleja entre la estructura y posición del conjugado y el flujo sanguíneo renal resultante. WT-RLX solo produjo aproximadamente un aumento del 25 % en el flujo sanguíneo renal sobre el nivel inicial, lo cual se esperaba conociendo la actividad vascular de relaxina. Se esperaba que

los diversos compuestos de prueba, que eran agonistas de relaxina (véase Ejemplo 7), también produjeran un aumento en el flujo sanguíneo renal. Sorprendentemente, sin embargo, se observó que algunos de los compuestos produjeron disminuciones en el flujo sanguíneo renal. Tal insuficiencia en el flujo sanguíneo renal podría ser una contraindicación clínicamente significativa, especialmente en la insuficiencia cardíaca, en donde se observa a menudo la insuficiencia renal. Todos los compuestos BM25/AN1. BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-C13-CH3, BM25/AN1- PEG36-Glu-C13-CH3, AQ1 y AQ1-Glu-C13-CH3 generaron un flujo sanguíneo renal insuficiente (Tabla 5 anterior).

Los resultados fueron inesperados e impredecibles. Los compuestos relacionados estructuralmente exhibieron efectos divergentes en el flujo sanguíneo renal. LEVEMIR®, una forma de insulina de acción prolongada aprobada por la FDA y comercializada para el tratamiento de diabetes, es un conjugado insulina-C13-CH3 cuya seguridad quedó demostrada (NDA 21-878 por Novo Nordisk A/S, página 1). Por el contrario, la administración de BM25/AN1-C13-CH3, cuya estructura es similar a LEVEMIR®, fue mortal en ratas, y la necropsia mostró riñones pálidos, lo que indica un bloqueo en el flujo sanguíneo renal. Además, la relaxina AQ1, que contiene una sustitución de un único aminoácido con para-acetil-fenilalanina en la posición 1 de la cadena A,

disminuyó el flujo sanguíneo renal, mientras que el compuesto AQ1-PEG de 20kDa, que contiene la misma sustitución de aminoácido no natural pero se conjuga con un PEG de 20kDa, aumentó el flujo sanguíneo renal. Asimismo, BM25/AN1-PEG36-Glu-C13-CH3 disminuyó el flujo sanguíneo renal, pero AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3 aumentó el flujo sanguíneo renal. Varios de los compuestos antes mencionados que disminuyeron el flujo sanguíneo renal contenían un mejorador PK que terminaba con un grupo metilo, por ejemplo, BM25/AN1-C13-CH3, BM25/AN1-PEG36-C13-CH3 y AQ1-Glu-C13-CH3. Sin embargo, los animales tratados con AQ1-EEEGGG-Glu$^{\gamma}$-C15-CH3 y AQ1-PEG36-Glu-C13-CH3 mostraron un flujo sanguíneo bueno, lo cual indicó que el grupo metilo no causó de manera invariable un flujo sanguíneo renal insuficiente. En contraste, AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, y otras moléculas de relaxina AQ1 de prueba conjugadas con un mejorador PK que comprendían un componente peptídico y un ácido graso -C13-COOH, -C14-COOH o -C15-COOH, generalmente, mostraron una mejoría en el flujo sanguíneo renal (Tabla 5 anterior).

Ejemplo 10: Estudios de toxicidad en ratas

AQ1-PEG de 20 kDa se administró a ratas por mediante subcutánea en dosis de 1.5 y 15 mg/kg/día durante 10 días. Después de la dosis final, los animales se sometieron a eutanasia, se disecaron, y se realizó histopatología del riñóNo. Se observaron vacuolos en

células epiteliales tubulares renales en todas las dosis (Figura 7C). Por el contrario, no se observaron vacuolos en células epiteliales tubulares renales de ratas que recibieron dosis de vehículo (150 mM de Arg en 10 mM de amortiguador de citrato, pH 5.5) por mediante subcutánea durante 10 días (Figura 7A).

AQ1-PEG36-Glu-C13-COOH se administró a ratas por mediante subcutánea en dosis de 10 y 40 mg/kg/día durante 7 días. Después de la dosis final, los animales se sometieron a eutanasia, se disecaron, y se realizó histopatología del riñóNo. Se observaron vacuolos en células epiteliales tubulares renales en todas las dosis (Figura 7B).

AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH se administró a ratas por mediante subcutánea en dosis de 5, 20 y 40 mg/kg/día durante 7 días. Después de la dosis final, los animales se sometieron a eutanasia, se disecaron, y se realizó histopatología del riñóNo. En todas las dosis, las células epiteliales tubulares renales parecían normales y no mostraron indicios de vacuolos relacionados con los artículos de prueba (Figura 7D).

El compuesto AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH también mostró buenos resultados de flujo sanguíneo renal (Ejemplo 9), perfil de solubilidad favorable (no se muestran datos) y una viscosidad considerablemente menor que AQ1-PEG de 20 kDa.

Ejemplo 11: Efecto de relaxina sobre los fibroblastos cardíacos humanos primarios

Los fibroblastos cardíacos humanos primarios (NHCF-V) se adquirieron de Lonza, Fairlawn, NJ (Cat. No.: CC-2904). Las células NHCF-V se aislaron del ventrículo de tejido de corazón adulto normal. La tinción demostró que las células expresaban α-actina del músculo liso y que expresaban ≥ 90 % de colágeno I y ≤ 10 % de factor VIII de Von Willebrand. Las células en los pasajes 3 a 6 se usaron para estudios en tiempo real de transcripción inversa cuantitativa-reacción en cadena de polimerasa (qRT-PCR). Las células se cultivaron en FGM™-3 BulletKit™ (Cat. No.: CC-4526, Lonza) que contenía 10 % de medio completo de FBS. En la confluencia, las células se dividieron y se cultivaron en placas de 6 cavidades a una densidad de 150.000/cavidad durante 24 h en medio completo. Posteriormente, las células se trasladaron a medio libre de suero (Cat. No.: CC-3131. medio basal de fibroblasto, Lonza) durante 24 h, luego se trataron con relaxina H2 humana (Cat. No.: 3596-RN, R&D Systems) o AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH en presencia de 0.5 ng/ml de TGF-β (Cat. No.: 240-B, R&D Systems) durante 24 horas más. La selección de concentraciones de TGF-β para la identificación y duración del tratamiento se basaron en informes anteriores. Las células en placas de 6 cavidades se cosecharon para la extracción total de ARN y el análisis de qRT-PCR.

El ARN total se extrajo usando el minikit RNeasy (Cat. No.: 74106, Qiagen) según los protocolos del fabricante, lo que incluye la supresión de cADN genómico sobre la columna. Se realizó qRT-PCR en tiempo real en dos etapas; la síntesis de cADN y la detección en tiempo real se llevaron a cabo en un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research) y un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), respectivamente. Se usó una mezcla maestra para PCR universal TaqMan (Applied Biosystems) en reacciones PCR posteriores según los protocolos del fabricante. Todas las reacciones qRT-PCR se realizaron en duplicado. Los cebadores específicos de secuencia para alfa-actina de músculo liso (sentido: 5'-AAATACTCTGTCTGGATCGGTGGCTCC-3' (SEQ ID NO:51); antisentido: 5'-CACATAGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGCTA-3' (SEQ ID NO:52)) y el gen *housekeeping* L30 (sentido: 5'-GCTGGAGTCGATCAACTCTAGG-3' (SEQ ID NO:53); antisentido: 5'-CCAATTTCGCTTTGCCTTGTC-3' (SEQ ID NO:54)) se diseñaron usando el *software* Primer Express Versión 2 (Applied Biosystems) en función de las secuencias publicadas (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los niveles de expresión de alfa actina de músculo liso se normalizaron a los niveles de expresión del gen *housekeeping* L30. Los fibroblastos cardíacos humanos tratados con AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH se analizaron para identificar diferencias significativas con respecto a las células tratadas con

vehículo usando una prueba T Student (Microsoft Excel, Versión 2013), en donde un valor P ≤ 0.05 se considera significativo.

Se demostró que AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH reduce la expresión del gen profibrótico, alfa-actina de músculo liso, en fibroblastos cardíacos humanos primarios tratados con TGF-beta (0.5 ng/ml; 24 h). Como se muestra en las Figuras 6A-6B, las disminuciones en la expresión génica dependían de la concentración y eran igualmente sólidas para la relaxina humana H2 y AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH. Se demostró que AQ1-GGGGS-Glu$^{\gamma}$ (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH se puede usar como agente antifibrótico para tratar enfermedades fibróticas, por ejemplo, fibrosis cardíaca.

Ejemplo 12: Ejemplos adicionales de mejoradores PK

Los mejoradores PK que se muestran en la siguiente Tabla 6 se produjeron, en general, de conformidad con los métodos descritos anteriormente en los Ejemplos 4, 5 y 6. Estos mejoradores PK se conjugaron con polipéptidos de relaxina modificada que comprendían un aminoácido codificado de manera no natural (por ejemplo, en la posición 1 de la cadena A, tal como RLX-AQ1) usando los métodos descritos en el Ejemplo 3 y se caracterizaron, lo que incluye la evaluación para determinar la actividad biológica, las propiedades farmacocinéticas, los efectos sobre el flujo sanguíneo renal, la formación de vacuolos y los efectos sobre

los fibroblastos cardíacos descritos en los Ejemplos 7-11.

Tabla 6. Ejemplos de mejoradores PK (las abreviaturas se indican en la Tabla 3 y se indican a continuación).

Estructura del mejorador PK	**Componente peptídico SEQ ID NO:**
AAAAAS-X-FA	159
AAAAS-X-FA	160
AAAS-X-FA	161
AASAASAASAA-X-FA	162
AASAASAAS-X-FA	163
AASAAS-X-FA	164
AASSA-X-FA	165
AAS-X-FA	166
AGAGS-X-FA	167
AGAGS-X-FA	168
AGAS-X-FA	169
AGAS-X-FA	170
AGGAS-X-FA	171
AGGAS-X-FA	172
AGGGS-X-FA	173
AGGGS-X-FA	174
AS-X-FA	175
$A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}$S-X-FA	176
$A^{\beta}A^{\beta}A^{\beta}$S-X-FA	177
$A^{\beta}A^{\beta}$S-X-FA	178
A^{β}S-X-FA	179

EGGEGG-Z-FA	180
EGGEGP-Z-FA	181
EGPEGP-Z-FA	182
GGAAS-X-FA	183
GGAAS-X-FA	184
GGAS-X-FA	185
GGAS-X-FA	186
GGGAS-X-FA	187
GGGAS-X-FA	188
GGGGGGS-X-FA	189
GGGGGS-X-FA	190
GGGGS-FA	191
GGGGS-PEG2-PEG2-X-FA	192
GGGGS-X-C14-COOH	193
GGGGS-X-FA-cola de ácido malónico	194
GGGGS-X-FA-cola de ácido succínico	195
GGGGS-Z-FA	196
GGGGS-Z-FA	197
GGGGT-FA	198
GGGSG-X-FA	199
GGGSSS-X-FA	200
GGGSS-X-FA	201
GGGSS-X-FA	202
GGGS-X-FA	203
GGGTTTT-X-FA	204
GGSGGGGG-X-FA	205
GGSGGSGGSGG-X-FA	206
GGSGGSGGS-X-FA	207

GGSGGS-X-FA	208
GGSGG-X-FA	209
GGSGS-X-FA	210
GGSSG-X-FA	211
GGSSSS-X-FA	212
GGSSS-X-FA	213
GGSS-X-FA	214
GGSS-X-FA	215
GGSS-X-FA	216
GGS-Z-FA	217
GGTTTT-X-FA	218
GGTTT-X-FA	219
GGTT-X-FA	220
GSGGG-X-FA	221
GSGGS-X-FA	222
GSGSGSGSGS-X-FA	223
GSGSGSGS-X-FA	224
GSGSGS-X-FA	225
GSGSG-X-FA	226
GSGS-X-FA	227
GSP-Z-FA	228
GSSSS-X-FA	229
GSSS-X-FA	230
GSS-X-FA	231
GS-Z-FA	232
GTTT-X-FA	233
GTT-X-FA	234
KGGGS-Z-FA	235

KGGKGG-Z-FA	236
KK-PEG2-PEG2-X-FA	237
KKS-FA	238
KKS-Z-FA	239
KKT-FA	240
KKT-Z-FA	241
KK-X-cola de ácido malónico	242
KK-X-cola de ácido succínico	243
KK-Z-FA	244
KPKS-Z-FA	245
KSGGGSK-Z-FA	246
KSGKSG-Z-FA	247
SGGGGG-X-FA	248
SGGGG-X-FA	249
SGGGG-X-FA	250
SGGGS-X-FA	251
SGGG-X-FA	252
SGG-X-FA	253
SG-X-FA	254

X = Glu^{γ}, (D)-Glu^{γ}, Asp^{α}, Asp^{β}, (D)-Asp^{α} o (D)-Asp^{β}

Z = (D)-Glu^{γ}, Asp^{α}, Asp^{β}, (D)-Asp^{α} o (D)-Asp^{β}

FA = ácido graso = por ejemplo, C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH; a menos que se indique lo contrario

Los mejoradores PK que se muestran en la Tabla 7 se sintetizaron, en general, de conformidad con los métodos descritos en los Ejemplos 3-5 en la presente. Estos

mejoradores PK se conjugaron con polipéptidos de relaxina modificada que comprendían un aminoácido codificado de manera no natural (por ejemplo, en la posición 1 de la cadena A, tal como en RLX-AQ1) usando los métodos descritos en el Ejemplo 3 y se caracterizaron, lo que incluye la evaluación para determinar la actividad biológica, las propiedades farmacocinéticas, los efectos sobre el flujo sanguíneo renal, la formación de vacuolos y los efectos sobre los fibroblastos cardíacos descritos en los Ejemplos 7-11.

Tabla 7. Ejemplos de mejoradores PK (abreviaturas: N-MeK: 6-N-metil lisina; Dap: ácido 2,3-diaminopropiónico; otros como en la Tabla 3).

Estructura del mejorador PK	**Componente peptídico SEQ ID NO:**
GS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	255
GGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	256
GSP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	257
EGGEGG-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	258
Glu$^{\gamma}$GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	259
EGGEGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	260
EGPEGP-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH	261
Espermina-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	
KGGGS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	262

KSGGGSK-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	263
KSGKSG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	264
KGGKGG-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	265
KPKS-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	266
dKdKdKdKdKdK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	267
DapDapDapDapDapDap-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	268
N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-N-MeK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	269
dKdKdKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	270
GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C15-COOH	271
GGGEEE-Glu$^{\gamma}$-C17-COOH	272
KKKKP-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	273
KKKKKK-C13-COOH	274
KAQKAQA-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	275
KKKKPKKKK-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	276
KKKKKKGGG-Glu$^{\gamma}$-C13-COOH	277
EEEGGG-dGlu$^{\gamma}$-C13-CH3	278
GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C13-CH3	279

Cabe destacar que los ejemplos y las modalidades descritas en la presente son solo ilustrativos, y que las diversas modificaciones o cambios en función de estos serán

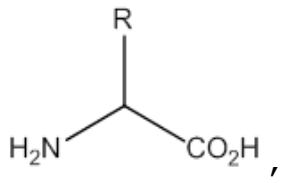
sugeridos a las personas de experiencia en la técnica y deben incluirse en el espíritu y el ámbito de la presente solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cabe aclarar también que la terminología utilizada en la presente tiene como fin describir modalidades de ejemplo únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente descripción, en donde aquellas solo están limitadas por las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y/u otros documentos citados en la presente solicitud se incorporan por referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y/u otros documentos individuales se incorporaran individualmente por referencia para todos los fines.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de relaxina modificada, caracterizado porque comprende un aminoácido codificado de manera no natural, en donde:

(a) el polipéptido de relaxina modificada comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituido con un aminoácido codificado de manera no natural en una posición seleccionada del grupo que consiste en: residuo 1 de la cadena A, residuo 2 de la cadena A, residuo 5 de la cadena A, residuo 13 de la cadena A, residuo 18 de la cadena A, residuo 5 de la cadena B, residuo 7 de la cadena B y residuo 25 de la cadena B, y que tienen opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos adicionales en la cadena A de relaxina y/o la cadena B de relaxina;

(b) el aminoácido codificado de manera no natural tiene la estructura:



,

en donde el grupo R es cualquier sustituyente diferente de la cadena lateral que se encuentra en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina,

lisina, metionina, fenilalanin, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina; y

(c) el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a un mejorador farmacocinético que comprende un componente peptídico de 2 a 30 aminoácidos y una porción de prolongación de semivida.

2. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido de la cadena A de relaxina comprende SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 y que opcionalmente tiene hasta sustituciones, inserciones y/o supresiones adicionales de aminoácidos.

3. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido de la cadena A de relaxina comprende SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 y que opcionalmente tiene una sustitución, inserción o supresión adicional de aminoácidos.

4. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el polipéptido de la cadena B de relaxina comprende SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 que tienen opcionalmente una sustitución, inserción o supresión adicional de aminoácidos.

5. El polipéptido de relaxina modificada de

conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido de la cadena A de relaxina comprende SEQ ID NO: 4 sustituida con el aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1, y tal polipéptido de la cadena B de relaxina comprende SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

6. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural comprende un grupo carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

7. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque un aminoácido codificado de manera no natural comprende un derivado de fenilalanina.

8. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural se selecciona de una fenilalanina para-sustituida, orto-sustituida o meta-sustituida.

9. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural se selecciona de una fenilalanina parasustituida, ortosustituida o metasustituida que comprende un grupo

carbonilo, un grupo aminooxi, un grupo hidrazida, un grupo hidrazina, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino.

10. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural comprende para-acetil-L-fenilalanina.

11. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al componente peptídico.

12. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural está ligado a tal mejorador farmacocinético mediante un enlace oxima o un enlace triazol.

13. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al mejorador farmacocinético mediante un enlace oxima.

14. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido de la cadena A de relaxina comprende SEQ ID NO: 35, y el polipéptido de la cadena B de relaxina comprende SEQ

ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, y en donde la cadena A o la cadena B de relaxina tiene opcionalmente hasta dos sustituciones, inserciones o supresiones adicionales de aminoácidos.

15. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de cadena B de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

16. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35.

17. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque un polipéptido de la cadena B de relaxina que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

18. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el polipéptido de la cadena A de relaxina comprende SEQ ID NO: 35, y el polipéptido de la cadena B de relaxina comprende SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

19. El polipéptido de relaxina modificada de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque el componente peptídico comprende de 2 a 25 aminoácidos.

20. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el componente peptídico comprende de 2 a 20 aminoácidos.

21. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el componente peptídico comprende de 3 a 10 aminoácidos.

22. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque el omponente peptídico comprende de 4 a 8 aminoácidos.

23. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con una de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque el componente peptídico comprende Glu, Glu^{Y}, GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 107), GETGSSGEGT-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 108), GGGKKK-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 109), GSHHHHHGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Sar-Sar-Sar-Sar-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 111), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 113), KKKSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 118), KKSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 114), KKSGGSGG-Glu^{α} (SEQ ID NO: 115), KKSAGSAG-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 116), KSGGSGG-Glu^{Y} (SEQ ID

NO: 117), KKSGGSGGEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 119), dKdKdKdKdK-Glu^Y (SEQ ID NO: 120), EESGGSGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 121), GSGSGSGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 123), EEEGGG-dGlu^Y (SEQ ID NO: 128), EGGGGSK-Glu^Y (SEQ ID NO: 130), EEEEEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 131), EEEEPEEEEPEEEEPEEEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 133), EEEEPEEEEPEEEEPEEGGG (SEQ ID NO: 135), EEEEGEEEEGEEEEGEEEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 136), KGGEEKKKEKEKEPKGGEEKKKEKEK-Glu^Y (SEQ ID NO: 137), EAQKAQAEAQKAQAEAQKAQA-Glu^Y (SEQ ID NO: 138), KK-Glu^Y (SEQ ID NO: 140), Glu^Y, KGPKGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 146), SGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 147), KGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 148), KGGGSE-Glu^Y (SEQ ID NO: 149), GSPGSP-Glu^Y (SEQ ID NO: 150), GGGGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 151), EGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 152), EGGGP-Glu^Y (SEQ ID NO: 153), KGPGSE-Glu^Y (SEQ ID NO: 154), Espermina-Glu^Y o KKGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 156).

24. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque el componente peptídico comprende GGGGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 139), DRDDRD (SEQ ID NO: 102), KKKKKK-Glu^Y (SEQ ID NO: 103), RGGEEKKKEKEK-Glu^Y (SEQ ID NO: 104), GGGEEE-Glu^Y (SEQ ID NO: 105), EEEGGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 106), KKKGGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 107), GGGKKK-Glu^Y (SEQ ID NO: 109), GSHHHHHGS-Glu^Y (SEQ ID NO: 110), Sar-Sar-Sar-Sar-Ser-Glu^Y (SEQ ID NO: 112), Sar-Sar-Sar-Glu-Glu-Glu^Y (SEQ ID NO: 113), o KSGGSGG-Glu^Y (SEQ ID NO: 117).

25. El polipéptido de relaxina modificada de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque el componente peptídico comprende Glu^{Y}.

26. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque el componente peptídico comprende GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139).

27. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, caracterizado porque comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituidas con un aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 de la cadena A, en donde el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al mejorador farmacocinético, y tal mejorador farmacocinético comprende el componente peptídico GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139).

28. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida comprende un ácido graso o un derivado de este, en donde el ácido graso o derivado de este se liga de manera covalente al componente peptídico.

29. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-27, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida

comprende un ácido graso saturado o un derivado de este.

30. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-29, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida comprende un ácido graso terminado con un ácido carboxílico.

31. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida comprende un ácido graso de la Fórmula I:

-Cn-COOH (Fórmula I)

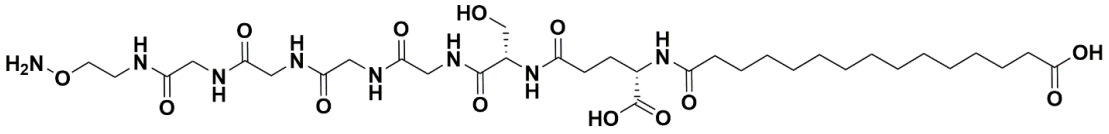
en donde n es de 10 a 18.

32. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque n es de 12 a 17.

33. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque n es 13, 14 o 15.

34. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida comprende -C14-COOH.

35. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-34, caracterizado porque el mejorador farmacocinético comprende:



GGGGS-Glu$^{\gamma}$-C14-COOH

(Fórmula II)

en donde el grupo aminooxi está ligado al aminoácido no natural en el polipéptido de relaxina modificada.

36. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-35, caracterizado porque la porción de prolongación de semivida está conjugada con el componente peptídico mediante un enlace amida.

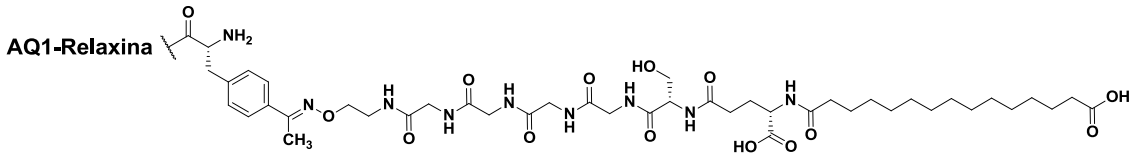
37. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 4 y el polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, sustituidos con un aminoácido codificado de manera no natural en el residuo 1 de la cadena A;

en donde el aminoácido codificado de manera no natural comprende para-acetil-L-fenilalanina ligada al mejorador farmacocinético que comprende

un componente peptídico que comprende GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139) y

una porción de prolongación de semivida que comprende -C14-COOH.

38. Un polipéptido de relaxina modificada, caracterizado porque comprende:



(Fórmula III),

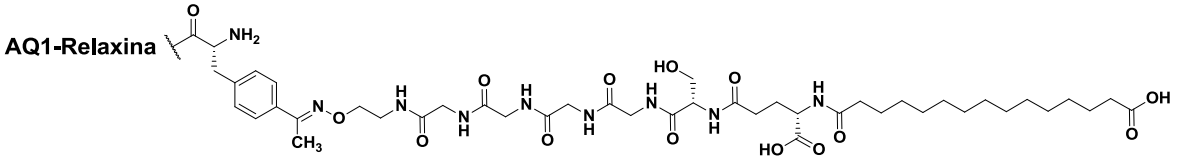
en donde AQ1-relaxina comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de cadena B de relaxina que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-fenilalanina modificada que se ilustra en la Fórmula III está ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina.

39. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque un polipéptido de la cadena A de relaxina que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 35.

40. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque un polipéptido de la cadena B de relaxina que tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

41. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque AQ1-relaxina comprende el polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

42. Un polipéptido de relaxina modificada, caracterizado porque comprende AQ1-GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139) -C14-COOH que comprende la estructura que se muestra en la Figura 8, que comprende la estructura que se muestra en la Figura 9, o que comprende un polipéptido de la cadena A de relaxina de SEQ ID NO: 35 y un polipéptido de la cadena B de relaxina de SEQ ID NO: 6, en donde la para-acetil-fenilalanina modificada ubicada en el N-terminal del polipéptido de la cadena A de relaxina se liga al mejorador PK GGGGS-Glu^{Y} (SEQ ID NO: 139)-C14-COOH, como se ilustra en la Fórmula III:



(Fórmula III).

43. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-42, caracterizado porque es biológicamente activo.

44. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-43,

caracterizado porque es terapéuticamente efectiva para el tratamiento de una o más enfermedades o afecciones asociadas a relaxina.

45. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-44, caracterizado porque produce menos formación de vacuolos renales en comparación con AQ1-PEG de 20 kDa.

46. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-45, caracterizado porque produce menos o no produce insuficiencia renal en comparación con AQ1-PEG de 20 kDa.

47. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque la función renal se mide determinando uno o más de los siguientes: tasa de filtración glomerular estimada, depuración de creatinina, tasa de filtración glomerular de insulina o tasa de filtración glomerular isotópica.

48. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-47, caracterizado porque no disminuye el flujo sanguíneo renal después de la administracióNo.

49. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-48, caracterizado porque es capaz de aumentar el flujo sanguíneo renal después de la administracióNo.

50. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con las reivindicaciones 48 o 49, caracterizado porque el flujo sanguíneo renal se mide determinando la depuración de para-aminohipurato.

51. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-50, caracterizado porque presenta una mayor semivida *in vivo*.

52. El polipéptido de relaxina modificada de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque la semivida *in vivo* aumenta al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces de aumento.

53. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 y un portador aceptable farmacéuticamente aceptable.

54. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 para el tratamiento de un trastorno asociado a relaxina y un portador aceptable farmacéuticamente aceptable.

55. Un método para tratar una enfermedad asociada a la relaxina, caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un

polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o de una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

56. Un método para tratar una enfermedad cardiovascular, caracterizado porque comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

57. El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque tal enfermedad cardiovascular se selecciona de arteriopatía coronaria, infarto de miocardio, arritmia, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía y enfermedad vascular.

58. Un método para tratar o aliviar un síntoma de una insuficiencia cardíaca, caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o de una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

59. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque tal insuficiencia cardíaca se selecciona de insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome cardiorrenal, insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal,

insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada a defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada a defectos de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca asociada a defectos combinados de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada a trastornos del almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión reducida (HFrEF), angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar.

60. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque tal insuficiencia cardíaca se puede seleccionar de insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión reducida (HFrEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción

de expulsión conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca crónica con fracción de expulsión en intervalo medio (HFmEF), insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca sistólica, reestructuración posterior al infarto de miocardio, angina, hipertensión, hipertensión pulmonar e hipertensión arterial pulmonar.

61. El método de conformidad con la reivindicación 58, caracterizado porque tal insuficiencia cardíaca se selecciona de insuficiencia cardíaca posaguda, insuficiencia cardíaca avanzada, síndrome cardiorrenal e insuficiencia cardíaca con insuficiencia renal.

62. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55-61, caracterizado porque también comprende administrar, en combinación, de manera concurrente o secuencial, con el polipéptido de relaxina modificada, al menos un agente terapéutico adicional seleccionado de inhibidores de ACE, bloqueadores β, diuréticos, antagonistas del receptor mineralocorticoide, moduladores del receptor de rianodina, activadores SERCA2a, inhibidores de renina, bloqueadores del canal de calcio, agonistas del receptor A1 de adenosina, receptor A1 de adenosina parcial, inhibidores de dopamina β-hidroxilasa, antagonistas del receptor de angiotensina II, antagonistas del receptor de angiotensina II con agonismo sesgado para seleccionar mediantes de transducción de señal celular, combinaciones de antagonistas

del receptor de angiotensina II e inhibidores de la enzima neprilisina, inhibidores de la enzima neprilisina, activadores de guanilato ciclasa soluble, activadores de miosina ATPasa, inhibidores de rho-quinasa 1, inhibidores de rho-quinasa 2, agonistas del receptor de apelina, compuestos donantes de nitroxilo, inhibidores de la quinasa II dependiente de calcio, agentes antifibróticos, inhibidores de galectina-3, antagonistas del receptor de vasopresina, moduladores del receptor de FPR2, agonistas del receptor de péptidos natriuréticos, bloqueadores del canal receptor de potencial transitorio vaniloide 4. agentes antiarrítmicos, bloqueadores del canal de la corriente "funny" I_f, nitratos, compuestos digitálicos, agentes inotrópicos y agonistas del receptor β, agentes reselladores de la membrana celular, por ejemplo, Poloxamer 188, agentes antihiperlipidémicos, agentes que aumentan HDL en plasma, agentes antihipercolesterolémicos, inhibidores del colesterol o la biosíntesis (tales como inhibidores de HMG CoA reductasa), agonista de LXR, agonista de FXR, probucol, raloxifeno, ácido nicotínico, niacinamida, inhibidores de la absorción del colesterol, secuestrantes del ácido biliar, resinas de intercambio aniónico, aminas cuaternarias, colestiramina, colestipol, inductores del receptor de lipoproteínas de baja densidad, clofibrato, fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, gemfibrizol, vitamina B6, vitamina B12. vitaminas

antioxidantes, agentes contra la diabetes, inhibidores de la agregación de plaquetas, antagonistas del receptor de fibrinógeno, derivados de aspirina y ácido fíbrico, inhibidores de PCSK9, aspirina, e inhibidores de P2Y12. tales como Clopidogrel.

63. Un método para tratar una enfermedad asociada a la fibrosis, caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o de una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

64. El método de conformidad con la reivindicación 62, caracterizado porque tal enfermedad asociada a la fibrosis comprende fibrosis del corazón, pulmón, riñón, médula ósea o hígado, fibrosis dermatológica o un síndrome de fibrosis ocular.

65. El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado porque la enfermedad asociada a la fibrosis se selecciona de: fibrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis, precirrosis, enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, fibrosis masiva progresiva, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis por inyección, fibrosis renal, enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, glomeruloesclerosis

focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefropatía por IgA, mielofibrosis, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca metabólica, fibrosis cardíaca, fibrosis por cataratas, cataratas, cicatrización ocular, fibrosis pancreática, fibrosis dérmica, fibrosis intestinal, estenosis intestinal, fibrosis endomiocárdica, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, enfermedad de Crohn, fibrosis retroperitoneal, queloide, fibrosis sistémica nefrogénica, escleroderma, esclerosis sistémica, artrofibrosis, síndrome de Peyronie, contractura de Dupuytren, neuropatía diabética, capsulitis adhesiva, enfermedad hepática alcohólica, hepatoesteatosis, hepatitis viral, enfermedad biliar, hemocromatosis primaria, cirrosis relacionada con los fármacos, cirrosis criptógena, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa 1-antitripsina, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), enfermedad pulmonar fibrótica humana, degeneración macular, retinopatía retinal, retinopatía vítrea, fibrosis miocárdica, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, enfermedad cardiovascular, ateroesclerosis/reestenosis, cicatrices hipertróficas, mielofibrosis primaria o idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria y colitis colagenosa,

66. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-65, caracterizado porque además comprende administrar, en combinación, de manera concurrente o

secuencial, con el polipéptido de relaxina modificada, al menos un agente contra la fibrosis a tal paciente.

67. El método de conformidad con la reivindicación 66, caracterizado porque al menos un agente antifibrótico se selecciona de nintedanib, Pirfenidone, antagonistas de LPA1. antagonistas del receptor de LPA1. análogos de GLP1. tralokinumab (IL-13, AstraZeneca), vismodegib (antagonista de hedgehog, Roche), PRM-151 (pentraxin-2. TGF beta-1. Promedior), SAR-156597 (Mab biespecífico IL-4&IL-13, Sanofi), simtuzumab (anticuerpo de tipo anti-lisil oxidasa 2 (anti-LOXL2), Gilead), CKD-942. PTL-202 (PDE inh./pentoxifilina/NAC oral de liberación control., Pacific Ther.), omipalisib (oral PI3K/mTOR inhibidor, GSK), IW-001 (mod. de solución oral de colágeno de tipo V bovino, ImmuneWorks), STX-100 (integrin alfa V/ beta-6 ant, Stromedix/ Biogen), Actimmune (IFN gamma), PC-SOD (midismase; inhalado, LTT Bio-Pharma / CKD Pharm), lebrikizumab (mAb anti-IL-13 SC humanizado, Roche), AQX-1125 (activador de SHIP1. Aquinox), CC-539 (inhibidor de JNK, Celgene), FG-3019 (FibroGen), SAR-100842 (Sanofi) y ácido obeticólico (OCA o INT-747, Intercept).

68. Un método para tratar o prevenir una insuficiencia renal, caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1-52 o de una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

69. Un método para mejorar, estabilizar o restablecer la función renal en un paciente que lo necesita, caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 53-54.

70. Un método para manufacturar un polipéptido de relaxina modificada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-52, caracterizado porque comprende:

(a) proporcionar un polipéptido que comprende la cadena A de relaxina y la cadena B de relaxina, en donde el polipéptido comprende el aminoácido codificado de manera no natural; y

(b) ligar tal aminoácido codificado de manera no natural al mejorador farmacocinético.

71. El método de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural está ligado al mejorador farmacocinético mediante un enlace oxima.

72. El método de conformidad con la reivindicación 71, caracterizado porque tal enlace de oxima se forma mediante la reacción de un grupo carbonilo y un grupo

aminooxi.

73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el grupo cabonilo es un sustituyente del aminoácido codificado de manera no natural, y tal grupo aminooxi es un constituyente de tal mejorador farmacocinético.

74. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el grupo aminooxi es un sustituyente del aminoácido codificado de manera no natural, y tal grupo carbonilo es un constituyente de tal mejorador farmacocinético.

75. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70-74, caracterizado porque el aminoácido codificado de manera no natural se incorpora ribosómicamente en tal polipéptido.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a polipéptidos de relaxina modificada, tales como los polipéptidos de relaxina humana 2 modificada, que comprenden un aminoácido codificado de manera no natural ligado a un mejorador farmacocinético, y los usos terapéuticos de tales polipéptidos, por ejemplo, para el tratamiento de afecciones cardiovasculares (tales como insuficiencia cardíaca) y/o afecciones relacionadas con la fibrosis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> POLIPÉPTIDOS DE RELAXINA MODIFICADA QUE COMPRENDEN UN MEJORADOR FARMACOCINÉTICO Y SUS USOS

<130> 46561.2401

<150> 62/456,161
<151> 2017-02-08

<160> 279

<210> 1
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser
50

<210> 2
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile
20 25 30

Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly
35 40 45

Met Ser Thr Trp Ser
50

<210> 3
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Arg Arg Glu
20 25 30

Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly
35 40 45

Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
50 55 60

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
65 70 75 80

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20

<210> 5
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser
20 25

<210> 7
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly
1 5 10 15

Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu
20 25 30

Gln Lys Arg
35

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Lys Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ile Glu Gly Gly Arg
1 5

<210> 10
<211> 72
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gc 72

<210> 11
<211> 87
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
gactcatgga tggaggaagt tattaaatta tgcggccgcg aattagttcg cgcgcagatt 60

gccatttgcg gcatgagcac ctggagc 87

<210> 12
<211> 159
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12
caactctaca gtgcattggc taataaatgt tgccatgttg gttgtaccaa aagatctctt 60

gctagatttt gcgactcatg gatggaggaa gttattaaat tatgcggccg cgaattagtt 120

cgcgcgcaga ttgccatttg cggcatgagc acctggagc 159

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
atgaaaaaga atatcgcatt tcttcttaaa cgg 33

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
atgattgaag gtggtcgt 18

<210> 15
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ile Glu Gly Gly Arg Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30

Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 16
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetasa mutante derivada de la sintetasa Methanococcus jannaschii

<400> 16

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

```
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
            20                  25                  30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Ile His
145                 150                 155                 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
```

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 17
<211> 77
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> tARN mutante derivado de tARN de Methanococcus jannaschii

<400> 17
ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccagcccgc cggacca 77

<210> 18
<211> 77
<212> ADN
<213> Methanococcus jannaschii

<400> 18
ccggcggtag ttcagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcatggcg ctggttcaaa 60

tccggcccgc cggacca 77

<210> 19
<211> 88
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> tARN supresor ámbar optimizado

<400> 19
cccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgttctc gtaggagttc 60

gagggttcga atcccttccc tgggacca 88

<210> 20
<211> 89
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Un tARN supresor del desplazamiento de AGGA optimizado

<400> 20
gcgagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggacttcct aatccgttct cgtaggagtt 60

cgagggttcg aatccctccc ctcgcacca 89

<210> 21
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-L-fenilalanina

<400> 21

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

```
Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300

Arg Leu
305
```

<210> 22
<211> 306
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-benzoil-L-fenilalanina

<400> 22

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Ser His
145 150 155 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 23
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 23

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

```
Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50                  55                  60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                 85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
                165                 170                 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
            180                 185                 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
        195                 200                 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
    210                 215                 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225                 230                 235                 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
                245                 250                 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
            260                 265                 270
```

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 24
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de propargil-fenilalanina

<400> 24

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Pro Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ile Pro Tyr
145 150 155 160

Leu Pro Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
165 170 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
180 185 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
195 200 205

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 25
<211> 305
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de

propargil-fenilalanina

<400> 25

```
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                  10                  15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
            20                  25                  30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Lys Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Ala Ile Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Ala Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile His
                165                 170                 175

Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His Asn
            180                 185                 190

Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser Lys
        195                 200                 205
```

Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys
210 215 220

Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240

Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys Arg
245 250 255

Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu Leu
260 265 270

Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys Asn
275 280 285

Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys Arg
290 295 300

Leu
305

<210> 26
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 26

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

```
Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145                 150                 155                 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285
```

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 27
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 27

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Leu His
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 28
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 28

```
Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1               5                  10                  15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
            20                  25                  30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Val His
145                 150                 155                 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220
```

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 29
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 29

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Thr
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

```
Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Ser Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Pro Ser His
145                 150                 155                 160

Tyr Gln Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300
```

Arg Leu
305

<210> 30
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

<400> 30

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Cys His
145 150 155 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 31
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil
-fenilalanina

<400> 31

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

```
Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Leu
            20                  25                  30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Thr His
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240
```

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 32
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-acetil-fenilalanina

<400> 32

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

```
Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Gly Gly His
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ile Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
        275                 280                 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
    290                 295                 300

Arg Leu
305
```

<210> 33
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 33

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Ala
20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
35 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
50 55 60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Arg Phe Gln Leu Asp Lys
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Val Ile His
145 150 155 160

Tyr Asp Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 34
<211> 306
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Aminoacil tARN sintetasa para la incorporación de p-azido-fenilalanina

<400> 34

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Gly
20 25 30

```
Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
    50                  55                  60

Leu Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Thr Phe Gln Leu Asp Lys
            100                 105                 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
    130                 135                 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Gln Val Asn Thr Tyr Tyr
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Gln Arg Lys Ile
                165                 170                 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
            180                 185                 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
                245                 250                 255
```

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Asp Leu Lys
275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
290 295 300

Arg Leu
305

<210> 35
<211> 24
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cadena A del polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es un aminoácido codificado de manera no natural, tal como para-acetil-L-fenilalanina

<400> 35

Xaa Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20

<210> 36
<211> 24
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cadena A del polipéptido de relaxina modificada

<400> 36

Asn Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20

<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cadena B del polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa es un aminoácido codificado de manera no natural, tal como para-acetil-L-fenilalanina

<400> 37

Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Xaa Ser Thr Trp Ser
20 25

<210> 38
<211> 94
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Polipéptido de relaxina modificada (secuencia prepro)

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa es un aminoácido codificado de manera no natural, tal como para-acetil-L-fenilalanina

<400> 38

Met Ile Glu Glu Gly Arg Ala Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
1 5 10 15

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
20 25 30

Thr Trp Ser Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu
35 40 45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Gly Arg Xaa Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
65 70 75 80

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
85 90

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ejemplo de secuencia líder de aminoácidos de insulina

<400> 39

Met Ile Glu Glu Gly Arg
1 5

<210> 40

<400> 40
000

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42

<400> 42
000

<210> 43

<400> 43
000

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<400> 45
000

<210> 46

<400> 46

000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<400> 50
000

<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 51
aaatactctg tctggatcgg tggctcc 27

<210> 52
<211> 30
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 52
cacataggta acgagtcaga gctttggcta 30

<210> 53
<211> 22
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cebador de PCR
<400> 53
gctggagtcg atcaactcta gg 22

<210> 54
<211> 21
<212> ADN
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 54
ccaatttcgc tttgccttgt c 21

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Etiqueta de purificación de polihistidina

<400> 55

His His His His His His Ser Gly Gly
1 5

<210> 56

<400> 56
000

<210> 57

<400> 57
000

<210> 58

<400> 58
000

<210> 59

<400> 59
000

<210> 60

<400> 60
000

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63

<400> 63
000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70
000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74

<400> 74
000

<210> 75

<400> 75
000

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80
000

<210> 81

<400> 81
000

<210> 82

<400> 82
000

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90
000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

<400> 93
000

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

<400> 99
000

<210> 100

<400> 100
000

<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de una relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 101

Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 102
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como C13-COOH

<400> 102

Asp Arg Asp Asp Arg Asp
1 5

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 103

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu
1 5

<210> 104

<211> 13
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 13
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 104

Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 105

Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 106
<211> 7

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 106

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 107

Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 11
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 108

Gly Glu Thr Gly Ser Ser Gly Glu Gly Thr Glu
1 5 10

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 109
Gly Gly Gly Lys Lys Lys Glu
1 5

<210> 110
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 110

Gly Ser His His His His His Gly Ser Glu
1 5 10

<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..4
<223> Sarcosina (N-metil glicina)

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6..9
<223> Sarcosina (N-metil glicina)
<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 111

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
1 5 10

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..4
<223> Sarcosina (N-metil glicina)

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 112

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Glu
1 5

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..3
<223> Sarcosina (N-metil glicina)

<220>
<221> RES_MOD

<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 113

Xaa Xaa Xaa Glu Glu Glu
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 114

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9

<223> carbon alfa ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 115

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 116

Lys Lys Ser Ala Gly Ser Ala Gly Glu
1 5

<210> 117
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de

semivida, tal como C13-COOH

<400> 117

Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 118

Lys Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5 10

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético
<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 11
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 119

Lys Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu Glu Glu
1 5 10

<210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..6
<223> D-aminoácidos

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 120

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9

<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 121

Glu Glu Ser Gly Gly Ser Gly Gly Glu
1 5

<210> 122
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de

semivida, tal como C15-COOH

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Glu
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 124

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético
<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C17-COOH

<400> 125

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-CH3

<400> 126

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-CH3

<400> 127

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> D-aminoácidos

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 128

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de

semivida, tal como C14-COOH

<400> 129

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 130

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Lys Glu
1 5

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 131

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 132

<400> 132
000

<210> 133
<211> 20
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 20
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-CH3

<400> 133

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu
20

<210> 134
<211> 20
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 20
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-CH3

<400> 134

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu
20

<210> 135
<211> 20
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 20
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como C14-CH3

<400> 135

Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Glu Pro Glu
1 5 10 15

Glu Gly Gly Gly
20

<210> 136
<211> 20
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 20
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-CH3

<400> 136

Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu
20

<210> 137
<211> 27
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 27
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 137

Lys Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Pro Lys Gly
1 5 10 15

Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu
20 25

<210> 138

<211> 22
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 22
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 138

Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu Ala
1 5 10 15

Gln Lys Ala Gln Ala Glu
20

<210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 139

Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 140
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 140

Lys Lys Glu
1

<210> 141
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 141

Lys Lys Glu
1

<210> 142

<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 142

Lys Lys Glu
1

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-CH3

<400> 143

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 144
<211> 3

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-CH3

<400> 144

Lys Lys Glu
1

<210> 145
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 145

Lys Gly Pro Glu
1

<210> 146
<211> 7
<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 146

Lys Gly Pro Lys Gly Pro Glu
1 5

<210> 147
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 147

Ser Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 148
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 148

Lys Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 149

Lys Gly Gly Gly Ser Glu Glu
1 5

<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 150

Gly Ser Pro Gly Ser Pro Glu
1 5

<210> 151
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 151

Gly Gly Gly Gly Pro Glu
1 5

<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>

<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 152

Glu Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 153

Glu Gly Gly Gly Pro Glu
1 5

<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD

<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 154

Lys Gly Pro Gly Ser Glu Glu
1 5

<210> 155

<400> 155
000

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 156

Lys Lys Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 157
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..4
<223> Sarcosina (N-metil glicina)

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 157

Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Glu
1 5

<210> 158
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético
<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..3
<223> Sarcosina (N-metil glicina)

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 158

Xaa Xaa Xaa Glu Glu Glu
1 5

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<400> 159

Ala Ala Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 160
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD

<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 160

Ala Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 161
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 161

Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 162
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD

<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 12
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 12
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 162

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Xaa
1 5 10

<210> 163
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 163

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Xaa
1 5 10

<210> 164
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 164

Ala Ala Ser Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 165
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>

<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 165

Ala Ala Ser Ser Ala Xaa
1 5

<210> 166
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 166

Ala Ala Ser Xaa
1

<210> 167
<211> 6
<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 167

Ala Gly Ala Gly Ser Xaa
1 5

<210> 168
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida

tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 168

Ala Gly Ala Gly Ser Xaa
1 5

<210> 169
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 169

Ala Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 170
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 170

Ala Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 171
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 171

Ala Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 172
<211> 6

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 172

Ala Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 173
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD

<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 173

Ala Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 174
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 174

Ala Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 175
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD

<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 175

Ala Ser Xaa
1

<210> 176
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..5
<223> unido mediante enlaces beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida

tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 176

Ala Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..4
<223> unido mediante enlaces beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 177

Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 178
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..3
<223> unido mediante enlaces beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 178

Ala Ala Ser Xaa
1

<210> 179
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..2
<223> unido mediante enlace beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,

(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 179

Ala Ser Xaa
1

<210> 180
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 180

Glu Gly Gly Glu Gly Gly Xaa
1 5

<210> 181
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 181

Glu Gly Gly Glu Gly Pro Xaa
1 5

<210> 182
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 182

Glu Gly Pro Glu Gly Pro Xaa
1 5

<210> 183
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 183

Gly Gly Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 184
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>

<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 184

Gly Gly Ala Ala Ser Xaa
1 5

<210> 185
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 185

Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 186
<211> 5
<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 186

Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 187
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6

<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 187

Gly Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 188
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 188

Gly Gly Gly Ala Ser Xaa
1 5

<210> 189
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1

<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 189

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 190

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 191

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 192
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 5..6
<223> unido mediante enlace -PEG2-PEG2-

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6

<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 192

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 193
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como C14-COOH

<400> 193

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 194
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un

residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH que tiene una cola de ácido malónico

<400> 194

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 195
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH que tiene una cola de ácido succínico

<400> 195

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 196
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 196

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 197
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD

<222> 6
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa
o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 197

Gly Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 198
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 198

Gly Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 199
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1

<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 199

Gly Gly Gly Ser Gly Xaa
1 5

<210> 200
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 200

Gly Gly Gly Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 201
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 201

Gly Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5

<210> 202
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 202

Gly Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5

<210> 203
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 203

Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 204
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 204

Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Xaa
1 5

<210> 205
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 206
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 12
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 12
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH
<400> 206

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Xaa
1 5 10

<210> 207
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,

(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 207

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa
1 5 10

<210> 208
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 208

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 209
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 209

Gly Gly Ser Gly Gly Xaa
1 5

<210> 210
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 210

Gly Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5

<210> 211
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 211

Gly Gly Ser Ser Gly Xaa
1 5

<210> 212
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 212

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 213
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 213

Gly Gly Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 214
<211> 5

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 214

Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5

<210> 215
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>

<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 215

Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5

<210> 216
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 216

Gly Gly Ser Ser Xaa
1 5

<210> 217
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>

<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 217

Gly Gly Ser Xaa
1

<210> 218
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 218

Gly Gly Thr Thr Thr Thr Xaa
1 5

<210> 219
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH
<400> 219

Gly Gly Thr Thr Thr Xaa
1 5

<210> 220
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,

(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 220

Gly Gly Thr Thr Xaa
1 5

<210> 221
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 221

Gly Ser Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 222
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 222

Gly Ser Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 11
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 11
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 223

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5 10

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 9
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 224

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5

<210> 225
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 225

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5

<210> 226
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 226

Gly Ser Gly Ser Gly Xaa
1 5

<210> 227
<211> 5

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 227

Gly Ser Gly Ser Xaa
1 5

<210> 228
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>

<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 228

Gly Ser Pro Xaa
1

<210> 229
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 229

Gly Ser Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 230
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>

<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 230

Gly Ser Ser Ser Xaa
1 5

<210> 231
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 231

Gly Ser Ser Xaa

1

<210> 232
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 232

Gly Ser Xaa
1

<210> 233
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 233

Gly Thr Thr Thr Xaa
1 5

<210> 234
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 234

Gly Thr Thr Xaa
1

<210> 235
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 235

Lys Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 236
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 236

Lys Gly Gly Lys Gly Gly Xaa
1 5

<210> 237
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 2..3
<223> unido mediante enlace -PEG2-PEG2-

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 237

Lys Lys Xaa
1

<210> 238
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un

residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 238

Lys Lys Ser
1

<210> 239
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 239

Lys Lys Ser Xaa
1

<210> 240
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 240

Lys Lys Thr
1

<210> 241
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 241

Lys Lys Thr Xaa
1

<210> 242
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como una cola de ácido malónico

<400> 242

Lys Lys Xaa
1

<210> 243
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>

<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como una cola de ácido succínico

<400> 243

Lys Lys Xaa
1

<210> 244
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 244

Lys Lys Xaa
1

<210> 245
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>

<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 245

Lys Pro Lys Ser Xaa
1 5

<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 246

Lys Ser Gly Gly Gly Ser Lys Xaa
1 5

<210> 247
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 247

Lys Ser Gly Lys Ser Gly Xaa
1 5

<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD

<222> 7
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 248

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 249
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un
residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina
modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta,
(D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida
tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 249

Ser Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 250
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 250

Ser Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 251
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida

tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 251

Ser Gly Gly Gly Ser Xaa
1 5

<210> 252
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 252

Ser Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 253
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un

residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 253

Ser Gly Gly Xaa
1

<210> 254
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> Glu-gamma, (D)-Glu-gamma, Asp-alfa, Asp-beta, (D)-Asp-alfa o (D)-Asp-beta

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como un ácido graso, tal como C13-COOH, C14-COOH o C15-COOH

<400> 254

Ser Gly Xaa
1

<210> 255
<211> 3
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 3
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 255

Gly Ser Glu
1

<210> 256
<211> 4
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 256

Gly Gly Ser Glu
1

<210> 257
<211> 4

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 4
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 257

Gly Ser Pro Glu
1

<210> 258
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 258

Glu Gly Gly Glu Gly Gly Glu
1 5

<210> 259
<211> 7
<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..2
<223> unido mediante enlace gamma

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 259

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 260
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 260

Glu Gly Gly Glu Gly Pro Glu
1 5

<210> 261
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C14-COOH

<400> 261

Glu Gly Pro Glu Gly Pro Glu
1 5

<210> 262
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 262

Lys Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

<210> 263
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 263

Lys Ser Gly Gly Gly Ser Lys Glu
1 5

<210> 264
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 264

Lys Ser Gly Lys Ser Gly Glu
1 5

<210> 265
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 265

Lys Gly Gly Lys Gly Gly Glu
1 5

<210> 266
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 5
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 266

Lys Pro Lys Ser Glu
1 5

<210> 267
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..6
<223> D-aminoácidos

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 267

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu
1 5

<210> 268
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..6
<223> ácido 2,3-diaminopropiónico

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7

<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 268

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 269
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..6
<223> 6-N-metil lisina

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 269

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
1 5

<210> 270
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un

residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1..3
<223> D-aminoácidos

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 270

Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 271
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C15-COOH

<400> 271

Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 272
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C17-COOH

<400> 272

Gly Gly Gly Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 273
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 273

Lys Lys Lys Lys Pro Glu
1 5

<210> 274
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD

<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida tal como C13-COOH

<400> 274

Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

<210> 275
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 8
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 275

Lys Ala Gln Lys Ala Gln Ala Glu
1 5

<210> 276
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1

<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 276

Lys Lys Lys Lys Pro Lys Lys Lys Lys Glu
1 5 10

<210> 277
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético
<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 10
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-COOH

<400> 277

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Gly Gly Glu
1 5 10

<210> 278
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina

modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> D-aminoácidos

<220>
<221> RES_MOD
<222> 7
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-CH3

<400> 278

Glu Glu Glu Gly Gly Gly Glu
1 5

<210> 279
<211> 6
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> Ligador sintético

<220>
<221> RES_MOD
<222> 1
<223> grupo carbonilo ligado opcionalmente a cadena lateral de un residuo de para-acetil-fenilalanina de un polipéptido de relaxina modificada

<220>
<221> RES_MOD
<222> 6
<223> carbono gamma ligado opcionalmente a una porción de prolongación de semivida, tal como C13-CH3

<400> 279

Gly Gly Gly Gly Ser Glu
1 5

46561-2413

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

VIII-3-1	**Declaration: Entitlement to claim priority** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 62/456,161 by virtue of the following:
VIII-3-1 (iv)		an assignment from DUBOWCHIK, Gene, M. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 22 August 2017 (22.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from GUDMUNDSSON, Olafur, S. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 10 August 2017 (10.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from HAN, Xiaojun to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 16 August 2017 (16.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from LAWRENCE, R., Michael to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 08 August 2017 (08.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from LIPOVSEK, Dasa to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 07 August 2017 (07.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from MADSEN, Cort, S. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 09 August 2017 (09.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from MAPELLI, Claudio to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 11 August 2017 (11.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from MORIN, Paul, E. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 09 August 2017 (09.08.2017)
VIII-3-1 (iv)		an assignment from MYERS, Michael, C. to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 08 August 2017 (08.08.2017)