

(10) International Publication Number
WO 2016/116842 A1(43) International Publication Date
28 July 2016 (28.07.2016)

(51) International Patent Classification:

A61K 47/48 (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2016/050206

(22) International Filing Date:

15 January 2016 (15.01.2016)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

62/107,040 23 January 2015 (23.01.2015) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(71) Applicants (for US only): **KANTER, Aaron** [US/US]; Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc., 400 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **USERA, Aimee Richardson** [US/US]; Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **ZECRI, Frederic** [FR/US]; Novartis Institutes for Biomedical Research, Inc., 100 Technology Square, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).(74) Common Representative: **NOVARTIS AG**; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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.

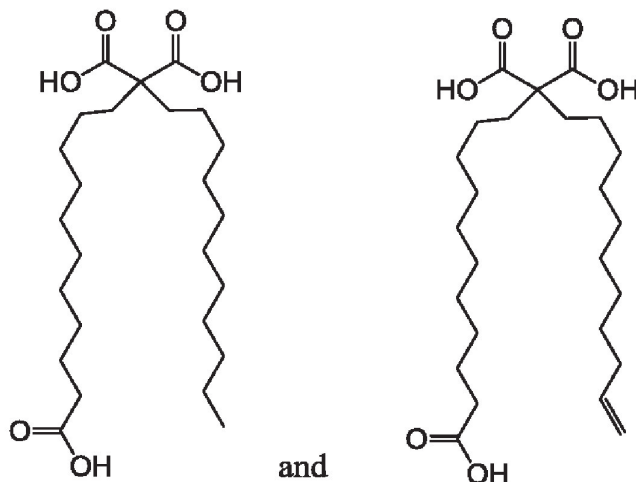
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, 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))

[Continued on next page]

(54) Title: SYNTHETIC APELIN FATTY ACID CONJUGATES WITH IMPROVED HALF-LIFE



(57) Abstract: The invention provides a conjugate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a synthetic polypeptide of Formula I: Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I) or a amide or ester thereof; and a fatty acid selected from: wherein said fatty acid is covalently linked to the N-terminus of the peptide via one of its carboxylic acid functionality, optionally via a polyethylene glycol linker; and wherein the two cysteine amino acids labeled with "*" form a disulfide bond between the thiol functionalities of their side chain. The conjugates are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the conjugates of the invention, and its therapeutic uses such as treatment or prevention of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic

attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

CONJUGADOS DE ÁCIDOS GRASOS Y APELINA SINTÉTICA CON MAYOR VIDA MEDIA

CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden moléculas biológicas semi-sintéticas que son bioconjugados de un polipéptido agonista de APJ y una fracción de ácido graso. En particular, los bioconjugados de la invención, no solo conservan la actividad agonística de APJ, sino que también presentan una mayor resistencia a la degradación proteolítica mediante la acción de las peptidasas, en comparación con su correspondiente polipéptido no alterado y/o en comparación con bioconjugados de apelina descritos previamente. La invención se refiere además a métodos de preparación de dicha composición y al uso de dichas composiciones como agente farmacéuticamente activo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION:

La incidencia de la insuficiencia cardíaca en el mundo occidental es de aproximadamente 1/100 adultos después de los 65 años de edad. La patología más común es un déficit crónico en la contractilidad cardíaca y, por lo tanto, en el gasto cardíaco, es decir, el volumen efectivo de sangre expulsada por cualquiera de los dos ventrículos del corazón con el paso del tiempo. Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica pueden tener episodios agudos de descompensación, es decir, la insuficiencia del corazón para mantener la circulación sanguínea adecuada, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más. Hay aproximadamente 500 mil hospitalizaciones al año por "insuficiencia cardíaca aguda descompensada" (ICAD), solo en los Estados Unidos.

Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos, vasodilatadores y fármacos inotrópicos, los cuales aumentan la contractilidad cardíaca directamente. Los fármacos inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) se usan en la fase aguda, a pesar de que están asociados con eventos adversos tales como arritmia y aumento de la mortalidad a largo plazo. Estos riesgos han impedido su aplicación en la insuficiencia cardíaca crónica. La digoxina es un fármaco inotrópico oral, pero está limitado por un estrecho margen terapéutico, su mayor potencial arritmogénico y la contraindicación en insuficiencia renal.

La ICAD requiere de manera urgente una terapia para la insuficiencia cardíaca que aumente la contractilidad cardíaca sin riesgos arritmogénicos o mortalidad, la cual también

podría ser una solución para las importantes necesidades médicas no satisfechas relacionadas con la insuficiencia cardíaca crónica.

La apelina es el ligando endógeno para el receptor acoplado a proteína G previamente huérfano (GPCR), APJ, también conocido como receptor de apelina, receptor de angiotensina tipo 1, receptor de angiotensina II tipo 1, y similares. La vía de la apelina/APJ se expresa
5 ampliamente en el sistema cardiovascular, y la apelina ha demostrado importantes efectos cardiovasculares beneficiosos en modelos preclínicos. La administración apelina aguda en los seres humanos provoca vasodilatación periférica y coronaria y aumenta el gasto cardíaco (Circulation. 2010; 121: 1818-1827). Como resultado, el agonismo de APJ se está convirtiendo
10 en un importante blanco terapéutico para los pacientes con insuficiencia cardíaca. Se cree que la activación del receptor de apelina APJ aumenta la contractilidad cardíaca y proporciona cardioprotección, sin los riesgos de las terapias actuales. Sin embargo, las apelinas inalteradas exhiben una vida media y una duración de acción *in vivo* muy cortas. La vida media muy corta es una de las principales dificultades identificadas en la entrega de estos péptidos
15 endógenos terapéuticos debido al rápido aclaramiento sérico y degradación proteolítica a través de la acción de las peptidasas.

Un método usado actualmente para superar esta desventaja es administrar grandes dosis del péptido terapéutico de interés al paciente de tal manera que incluso si algunos péptidos terapéuticos se degradan, quede suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Sin
20 embargo, este método es incómodo para los pacientes. Debido a que la mayoría de los péptidos terapéuticos no pueden ser administrados por vía oral, el péptido terapéutico tendría que ser infundido constantemente, infundido frecuentemente mediante inyección intravenosa o administrado frecuentemente a través de inyecciones subcutáneas, lo cual es muy inconveniente. La necesidad de una administración frecuente también hace que muchos de
25 los tratamientos con agentes terapéuticos peptídicos potenciales tengan un alto costo proyectado inaceptable. La presencia de grandes cantidades de péptido degradado también puede generar efectos secundarios no deseados.

El malestar asociado a la administración y los altos costos son dos razones por las que la mayoría de los péptidos terapéuticos con perfiles de bioactividad atractivos no pueden ser
30 desarrollados como candidatos a fármacos.

Por lo tanto, un enfoque que prolongue la vida media de los péptidos consiste en modificar los péptidos terapéuticos de tal modo que su degradación sea más lenta, conservando al mismo tiempo su actividad biológica. Estos polipéptidos modificados sintéticamente fueron descritos en la patente de Estados Unidos No. 8,673,848 (Expediente

No. PAT054961-US-NP). Otro enfoque incluye reducir la tasa de aclaramiento mediante la conjugación de los péptidos a una o más moléculas tales como fracciones de ácidos grasos que puedan impedir su eliminación a través de los riñones. Ejemplos de dichos conjugados de ácidos grasos fueron descritos en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/082327 (PAT056274-US-PSP2), en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 14/336,290 (PAT055781-US-NP) y en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 14/336,262 (PAT055418-US-NP).

Sin embargo, estos bioconjugados pueden seguir siendo susceptibles a la actividad de la proteasa o es posible que ya no sean tan activos como sus análogos no conjugados.

Por lo tanto, hay una necesidad de péptidos terapéuticos modificados que tengan una mayor vida media con el fin proporcionar mayor duración de acción in vivo, manteniendo al mismo tiempo una baja toxicidad, pero conservando las ventajas terapéuticas de los péptidos modificados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA:

La FIG. 1 representa los perfiles de exposición plasmática de ratones del compuesto de los Ejemplos 1 y 4 después de la administración de dosis por vía subcutánea.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION:

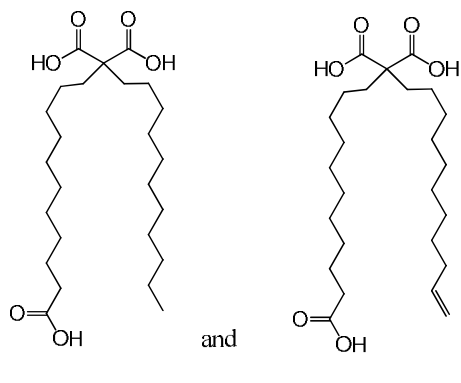
El propósito de la presente invención es solucionar el problema de la degradación de péptidos en el cuerpo modificando el péptido terapéutico o polipéptido de interés, es decir, los agonistas de APJ.

En consecuencia, el objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos conjugados, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, que comprendan a) un péptido que tiene la siguiente fórmula (I):

a. un péptido agonista de APJ que tiene la siguiente fórmula (I):

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I); o una amida o éster del mismo, o un péptido sustancialmente equivalente al mismo; en el que los dos aminoácidos de cisteína marcados con "*" forman un enlace disulfuro entre las funcionalidades tiol de su cadena lateral; y

b. un ácido graso seleccionado de:



en el que dicho ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido a través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico, opcionalmente a través de un enlazador polietilenglicol.

5 En una modalidad, los conjugados de la invención tienen al menos una de las siguientes mejoras con respecto a la apelina de tipo salvaje, con respecto a los análogos de apelina no alterados (no conjugados) (por ejemplo, Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F) y/o con respecto a otros conjugados de apelina descritos anteriormente: aumento de la vida media; mayor inmunidad a la degradación después de la administración y/o después de la

10 solubilización; mayor actividad agonista en el receptor APJ. De esta manera, los conjugados de apelina de esta invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares tales como la insuficiencia cardíaca, trastornos y afecciones asociados con la insuficiencia cardíaca, y trastornos y afecciones que responden a la activación de la actividad del receptor APJ.

15

Cualquiera de los residuos de aminoácidos de Fórmula I mencionados anteriormente puede ser sustituido de manera conservadora, siempre y cuando el conjugado de la invención siga conservando su actividad funcional y propiedades estructurales (por ejemplo, prolongación de la vida media, protección contra la degradación, restricción conformacional).

20 El principio y los ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos permitidas se explican de manera más detallada más adelante en este documento.

El ácido graso, siendo una fracción que extiende la vida media, se conecta de manera que mejora, y/o no interfiere con, la función biológica de las partes constituyentes de los

25 conjugados de la invención. Por ejemplo, La fracción de ácido graso se conecta a la funcionalidad amino del extremo N-terminal del péptido (cuando el enlazador no está

presente) a través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico, formando un enlace amida. Alternativamente, la fracción de ácido graso se conecta a la funcionalidad amino del enlazador PEG (cuando el enlazador está presente) a través de uno de sus grupos funcionales de ácido carboxílico.

5

En una modalidad, los conjugados de la invención son particularmente útiles en el tratamiento o prevención de un trastorno o afección asociados con la insuficiencia cardíaca, o un trastorno que responde a la activación (o agonismo) de la actividad del receptor APJ. En otra modalidad, los conjugados de la invención son útiles en el tratamiento de insuficiencia
10 cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios,
15 lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

En una modalidad preferida, los conjugados de apelina de la invención son útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD). En otra modalidad preferida, los conjugados de apelina son útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca
20 crónica.

En otra modalidad, la invención se refiere a un método para tratar un trastorno o enfermedad que responde a la activación del receptor APJ, en un sujeto que necesita dicho tratamiento, el cual comprende: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un conjugado de
25 la invención de manera que se proporciona tratamiento para el trastorno o enfermedad que responde a la activación del receptor APJ en el sujeto que es tratado.

En aún otra modalidad, la invención se refiere a un método de fabricación de los conjugados tal como se describe en el presente documento.

En aún otra modalidad, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, las
30 cuales comprenden un conjugado de la invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En aún otra modalidad, la invención se refiere a combinaciones, incluyendo un conjugado de la invención, y a combinaciones farmacéuticas de uno o más agentes terapéuticamente activos.

En otra modalidad, la invención se refiere a un método para la activación del receptor APJ en un sujeto que lo necesita, el cual comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de la invención.

Estos y otros aspectos de la invención se aclararán en la siguiente descripción
5 detallada de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición

10 Para efectos de interpretación de esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se especifique lo contrario y, según sea apropiado, los términos utilizados en singular incluirán también el plural y viceversa.

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

25 El término "APJ" (también conocido como "receptor de apelina", "receptor de angiotensina tipo 1", "receptor de angiotensina II tipo 1", y similares) indica un receptor acoplado a *Gi* con 7 dominios transmembrana y 380 residuos, cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en humanos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_005152.1, y
30 codificada por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_005161). APJ fue clonado por primera vez en 1993 a partir de ADN genómico humano usando cebadores de oligonucleótidos degenerados (O'Dowd et al. Gene, 136: 355-60, 1993) y comparte homología significativa con el receptor de angiotensina II tipo 1. Sin embargo, a pesar de esta homología, la angiotensina

Il no se une APJ. Aunque huérfano durante muchos años, el ligando endógeno fue aislado y llamado apelina (Tatemoto et al., Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998)).

5 Tal como se usa en el presente documento, la "activación de la actividad del receptor APJ" o la "activación del receptor APJ" se refiere a un aumento en la actividad del receptor APJ. La activación de la actividad del receptor APJ también se conoce como "agonismo" del receptor APJ, por ejemplo, mediante la administración de los conjugados de la invención.

10 El término "apelina", indica una pre-proteína con 77 residuos (Secuencia de Referencia NCBI: NP_0059109.3, y codificada por la Secuencia de Referencia NCBI: NM_017413.3), que se procesa en formas biológicamente activas de péptidos de apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12. El péptido maduro de extensión completa, el cual se conoce como "apelina-36", consta de 36 aminoácidos, pero la isoforma más potente es la forma piroglutamada de un 13mer de apelina (apelina-13), que se conoce como "pir-1-
15 apelina-13 o pir¹-apelina-13". Diferentes formas de apelina se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6,492,324B1.

Los términos "péptido agonista de APJ" o "péptido apelina" se usan indistintamente e incluyen la "apelina" tal como se definió anteriormente, la cual fue modificada para minimizar
20 la degradación y para mejorar la estabilidad en suero, así como para proporcionar un mejor perfil de desarrollabilidad. En ciertas modalidades, el "péptido agonista de APJ" o "péptido apelina" incluye un péptido de fórmula (I).

Tal como se usan en el presente documento, los términos "péptido" o "polipéptido" se
25 usan indistintamente para referirse a dos o más aminoácidos unidos entre sí. Las abreviaturas de tres letras o una letra reconocidas en la técnica se usan para representar los residuos de aminoácidos que constituyen los péptidos y polipéptidos de la invención. Excepto cuando está precedido por una "D", el aminoácido es un L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una letra mayúscula, se refiere al L-aminoácido. Cuando la abreviatura de una letra es una
30 letra minúscula, se refiere al D-aminoácido. Las abreviaturas de aminoácidos o grupos o cadenas se usan para representar péptidos. Los péptidos se indican con el extremo N-terminal a la izquierda y la secuencia está escrita desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal.

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

5 Ciertos aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante la tecnología descrita en Deiters et al., J Am Chem Soc 125: 11782-11783, 2003; Wang y Schultz, Science 301: 964-967, 2003; Wang et al., Science 292: 498-500, 2001; Zhang et al., Science 303: 371-373, 2004 o en la Patente de Estados Unidos No. 7,083,970. De manera breve, algunos de estos sistemas de expresión implican mutagénesis dirigida a un sitio específico para introducir un
10 codón sin sentido, tal como un TAG de color ámbar, en el marco abierto de lectura que codifica un polipéptido de la invención. Luego, dichos vectores de expresión se introducen en un huésped que puede usar un ARNt específico para el codón sin sentido introducido y se cargan con un aminoácido no natural seleccionado.

15 Un experto en la técnica entenderá que se pueden hacer diversas sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras, en la secuencia de cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, sin que necesariamente se disminuya su actividad. Tal como se usa en el presente documento, "aminoácido comúnmente usado como un sustituto del mismo" incluye sustituciones conservadoras (es
20 decir, sustituciones con aminoácidos de características químicas comparables). Para fines de sustitución conservadora, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares (hidrófilos) incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los
25 aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos incluyen la sustitución de un L-aminoácido con su D-aminoácido correspondiente, la sustitución de cisteína con homocisteína u otros aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene tiol, la sustitución de una lisina con homolisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, ornitina u otros
30 aminoácidos no naturales que tienen una cadena lateral que contiene amino, o la sustitución de una alanina con norvalina o similares.

El término "aminoácido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos de origen natural, aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen

natural, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite dichas formas estereoisoméricas. En el presente documento, los aminoácidos se denominan usando cualquiera de sus nombres, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

5 El término "de origen natural" se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y que no son manipulados por el hombre. Del mismo modo, los términos "de origen no natural", "no naturales", y similares, tal como se usan en el presente documento, se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre. Cuando se usa en conexión con los aminoácidos, el término "de
10 origen natural" se refiere a los 20 aminoácidos convencionales (es decir, alanina (A o Ala), cisteína (C o Cis), ácido aspártico (D o Asp), ácido glutámico (E o Glu), fenilalanina (F o Fen), glicina (G o Gli), histidina (H o His), isoleucina (I o Ile), lisina (K o Lis), leucina (L o Leu), metionina (M o Met), asparagina (N o Asn), prolina (P o Pro), glutamina (Q o Gln), arginina (R o Arg), serina (S o Ser), treonina (T o Tre), valina (V o Val), triptófano (W o Trp) y tirosina (Y o Tir)).

Los términos "aminoácido de origen no natural" y "aminoácido no natural", tal como se usan en el presente documento, se emplean indistintamente para representar estructuras de aminoácidos que no es posible generar mediante biosíntesis en ningún organismo usando genes modificados o no modificados de algún organismo, ya sea el mismo o diferente. Los
20 términos se refieren a un residuo de aminoácido que no está presente en la secuencia de la proteína de apelina de origen natural (de tipo salvaje) o en las secuencias de la presente invención. Estos incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, aminoácidos modificados y/o análogos de aminoácidos que no son uno de los 20 aminoácidos de origen natural, selenocisteína, pirrolisina (PIL), o pirrolina-carboxi-lisina (PCL, por ejemplo, tal como se describe
25 en la Publicación de Patente PCT WO2010/48582). Dichos residuos de aminoácidos no naturales se pueden introducir mediante la sustitución de aminoácidos de origen natural y/o mediante la inserción de aminoácidos no naturales en la secuencia de la proteína de apelina de origen natural (de tipo salvaje) o en las secuencias de la presente invención. El residuo de aminoácido no natural también se puede incorporar de manera tal que se imparta una
30 funcionalidad deseada a la molécula de apelina, por ejemplo, la capacidad de enlazar una fracción funcional (por ejemplo, PEG). Cuando se usa en conexión con los aminoácidos, el símbolo "U" se debe entender como "aminoácido de origen no natural" y "aminoácido no natural", tal como se usa en el presente documento.

Además, se entiende que dichos "aminoácidos no naturales" requieren un ARNt modificado y una sintetasa de ARNt modificado (RS) para la incorporación en una proteína. Estos pares ARNt/RS ortogonales "seleccionados" se generan mediante un proceso de selección tal como el desarrollado por Schultz et al. o a través de mutación aleatoria o específica. A modo de ejemplo, la pirrolina-carboxi-lisina es un "aminoácido natural", ya que es generada biosintéticamente mediante la transferencia de genes de un organismo a células huésped y es incorporada en las proteínas usando genes de sintetasa de ARNt y ARNt natural, mientras que la p-aminofenilalanina (Véase Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Ene 29; 125(4): 935-9) es un "aminoácido no natural", ya que, aunque es generada biosintéticamente, es incorporada en las proteínas mediante un par de sintetasa de ARNt/ARNt ortogonal "seleccionado".

Los aminoácidos codificados modificados incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, butilglicina terciaria, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-metilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, pentilglicina, ácido pipecólico y tioprolina. El término "aminoácido" también incluye aminoácidos de origen natural que son metabolitos en ciertos organismos, pero no son codificados por el código genético para la incorporación en proteínas. Dichos aminoácidos incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, ornitina, D-ornitina y D-arginina.

El término "análogo de aminoácido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. A modo de ejemplo únicamente, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Los análogos de aminoácidos incluyen aminoácidos naturales y no naturales que están bloqueados químicamente, reversible o irreversiblemente, o en los que su grupo carboxilo C-terminal, su grupo amino N-terminal y/o sus grupos funcionales de cadena lateral están químicamente modificados. Dichos análogos incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, sulfóxido de metionina, sulfona de

metionina, S-(carboximetil)-cisteína, sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína, sulfona de S-(carboximetil)-cisteína, ácido aspártico-(beta-metil éster), N-etilglicina, carboxamida de alanina, homoserina, norleucina, metionina y sulfonio de metilo.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "amida" se refiere a un derivado de amida del grupo de ácido carboxílico en el extremo C-terminal (por ejemplo, $-C(O)NH_2$, alquilo $-C(O)NH-C_{1-6}$, alquilfenilo $-C(O)NH-C_{1-2}$, alquilo $-C(O)NH-NHBn$ o $-C(O)N(C_{1-6})_2$).

10 El término "amida" también se refiere a derivados del grupo amino en el extremo N-terminal (por ejemplo, funcionalidad de ácido carboxílico del ácido graso formando un enlace amida con la funcionalidad amino en el extremo N-terminal del péptido apelina).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "éster" se refiere a un derivado de éster del grupo ácido carboxílico en el extremo C-terminal (por ejemplo, $-COOR$), donde R del éster se refiere a grupos alquilo C_{1-6} tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, etc., grupos cicloalquilo C_{3-8} tales como ciclopentilo, ciclohexilo, etc., grupos arilo C_{6-10} tales como fenilo, α -naftilo, etc., grupos alquilo C_{1-6} arilo C_{6-10} , por ejemplo, grupos alquilo C_{1-2} fenilo tales como bencilo, fenetilo, benzhidrido, etc., y grupos alquilo C_{1-2} α -naftil tales como α -naftilmetilo y similares. También se deben mencionar el éster de pivaloiloximetilo y similares, los cuales se usan comúnmente en forma de ésteres para administración oral. Cuando los péptidos agonistas de APJ de Fórmula I tienen grupos carboxilo o carboxilato adicionales en

20 posiciones diferentes al extremo C-terminal, aquellos polipéptidos en los que dichos grupos están amidados o esterificados también entran en la categoría del polipéptido de la invención. En estos casos, los ésteres pueden ser, por ejemplo, el mismo tipo de ésteres que los ésteres C-terminales anteriormente mencionados.

25 Los términos "conjugado" y "bioconjugado" se usan indistintamente y se refieren a la entidad formada como resultado de una unión covalente de un polipéptido agonista de APJ, o un polipéptido de Fórmula I, y una fracción de ácido graso a través de un enlazador de polietilenglicol (PEG) opcional.

30 El término "aumento de la vida media" o "aumento de la vida media en suero" o "prolongación de la vida media" se entiende como el cambio positivo en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada (por ejemplo, apelina 13 o análogo) con respecto a su forma no modificada (o forma no alterada del péptido). La vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en diversos puntos temporales después

de administrar la molécula biológicamente activa, y determinando la concentración de dicha molécula en cada muestra. Medir el cambio de la concentración en suero a través del tiempo permite el cálculo de la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo, molécula conjugada). Comparar la vida media en suero de una molécula modificada (por ejemplo, molécula conjugada) con la de una molécula no modificada (por ejemplo, apelina 13 o análogo) permite determinar el aumento relativo de la vida media en suero o $t_{1/2}$. El aumento deseado es de al menos aproximadamente dos veces, pero un menor aumento puede ser media también.

Conjugados de la invención

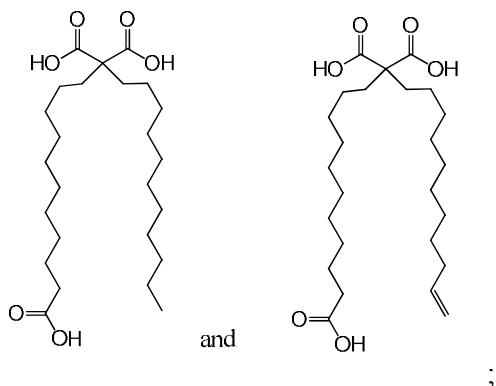
El presente documento describe diversas modalidades de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada modalidad se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar modalidades adicionales.

Por lo tanto, en la modalidad 1, la invención proporciona un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende

a. un péptido agonista de APJ que tiene la siguiente fórmula (I):

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I); o una amida o éster del mismo, o un péptido sustancialmente equivalente al mismo; en el que los dos aminoácidos de cisteína marcados con "*" forman un enlace disulfuro entre las funcionalidades tiol de su cadena lateral;

b. un ácido graso seleccionado de:



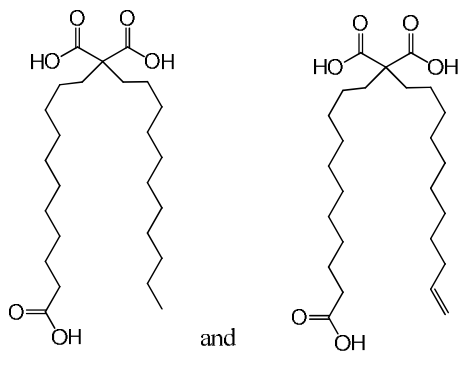
en el que dicho ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido a través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico, opcionalmente a través de un enlazador polietilenglicol.

- 5 En la modalidad 1A, la invención proporciona un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende

a. un péptido agonista de APJ que tiene la siguiente fórmula (I):

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I); en el que los dos aminoácidos de cisteína marcados con "*" forman un enlace disulfuro entre las funcionalidades
10 tiol de su cadena lateral; y

b. un ácido graso seleccionado de:

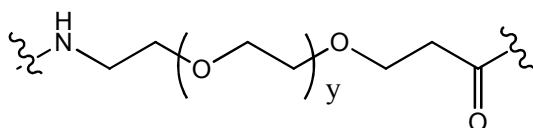


en el que dicho ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido a
15 través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico, opcionalmente a través de un enlazador polietilenglicol.

Los ácidos grasos descritos en la modalidad 1 o 1A fueron descritos en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/082327 (PAT056274-US-PSP2).

- 20 Cualquier grupo enlazador de polietilenglicol es opcional. El enlazador es de naturaleza polimérica y es una fracción de polietilenglicol que contiene dos grupos reactivos/grupos funcionales, uno de los cuales puede reaccionar con el polipéptido de fórmula I y el otro con la fracción de ácido graso.

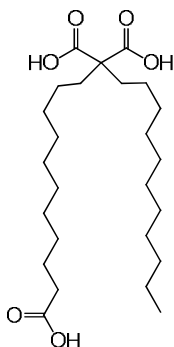
En la modalidad 2, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la modalidad 1 o 1A, en el que el enlazador de polietilenglicol (PEG) está presente y es de Fórmula (III):



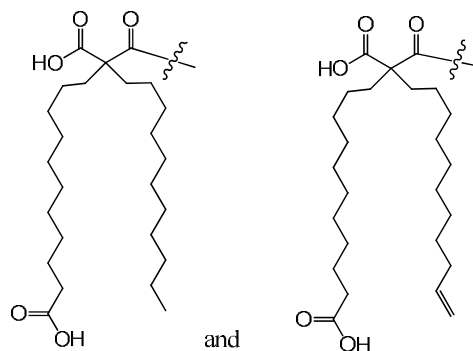
(III) donde y es 1-30, donde la funcionalidad carbonilo del enlazador de PEG forma un enlace amida con la funcionalidad amino en el extremo N-terminal del péptido de Fórmula (I) y donde la funcionalidad amino del enlazador de PEG forma un enlace amida con uno de los grupos funcionales de ácido carboxílico del ácido graso.

En la modalidad 3, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la modalidad 1, 1A o 2, en el que el enlazador de polietilenglicol (PEG) es de Fórmula (III) e y es 2 a 25:

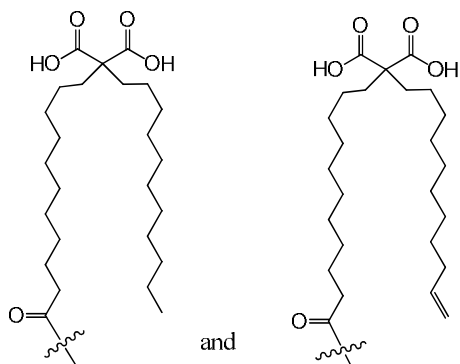
En la modalidad 4, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en la que el ácido graso es:



En la modalidad 5, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en el que el ácido graso se conecta a la funcionalidad amino del enlazador de PEG, o a la funcionalidad amino en el extremo N-terminal del péptido si el enlazador de PEG no está presente, mediante una de sus funcionalidades de ácido carboxílico terminal. Esto está representado por las siguientes Fórmulas, las cuales muestran el punto de unión al enlazador o al extremo N-terminal del péptido:

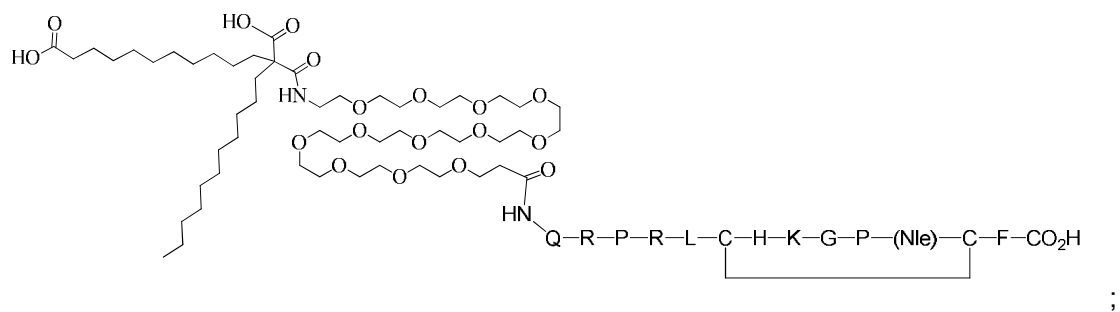
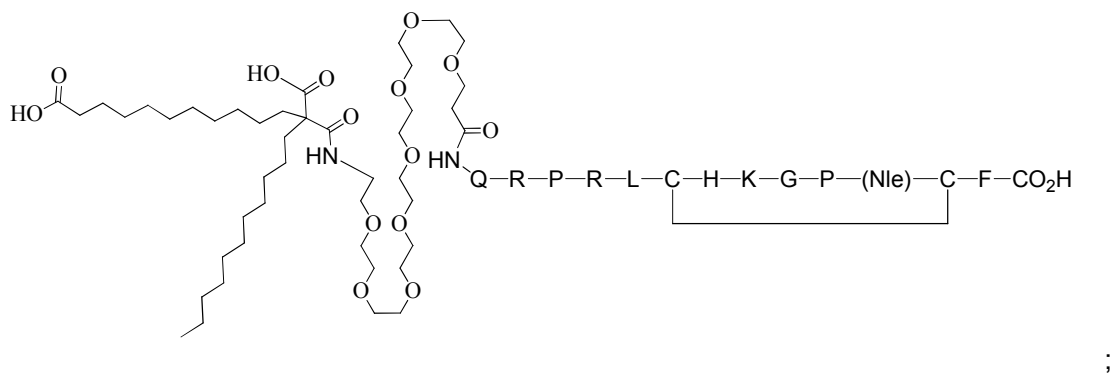
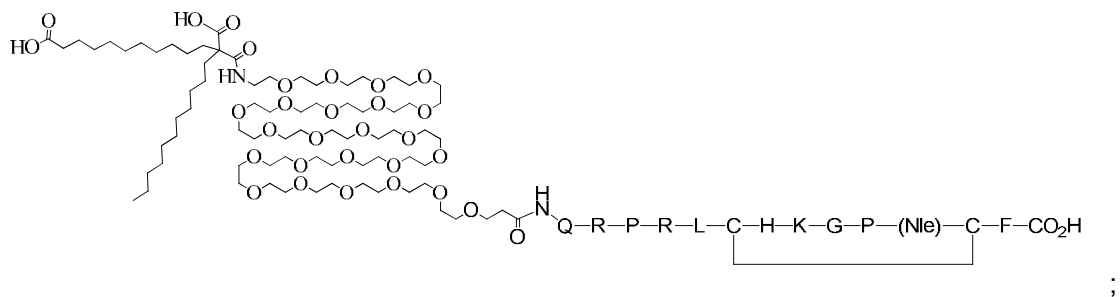


En la modalidad 6, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-4, en el que el ácido graso se conecta a la funcionalidad amino del enlazador de PEG, o a la funcionalidad amino del péptido si el enlazador de PEG no está presente, mediante su funcionalidad de ácido carboxílico terminal. Esto está representado por las siguientes Fórmulas, las cuales muestran el punto de unión al enlazador o al extremo N-terminal del péptido:

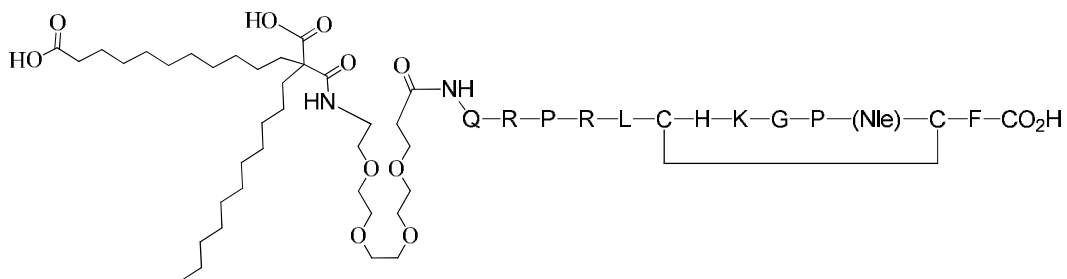


10

En la modalidad 7, la invención se refiere a un conjugado de acuerdo con la modalidad 1 o 1A seleccionado de los siguientes:



y



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

A menos que se especifique lo contrario, los términos "polipéptido" o "péptido", "agonistas peptídicos de APJ" y similares se refieren a un polipéptido de Fórmula (I) o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 En la modalidad 7A, los conjugados de la invención demuestran: 1. actividad sustancialmente equivalente o mejorada en relación con la apelina de tipo salvaje, la apelina-13, la pir-1-apelina-13 y/o el correspondiente péptido apelina no alterado (no conjugado) de Fórmula (I) o un análogo del mismo; y/o 2. mejor estabilidad en plasma en relación con la apelina de tipo salvaje, la apelina-13, la pir-1-apelina-13 y/o el correspondiente péptido apelina
10 no modificado (no conjugado) de Fórmula (I) o un análogo del mismo.

 En la modalidad 7B, los conjugados de la invención demuestran: 1. actividad sustancialmente equivalente o mejorada en relación con los conjugados de apelina descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 14/336,293 (PAT055781-US-NP) y/o en
15 relación con los conjugados de ácidos grasos de apelina descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No 14/336 262 (PAT055418-US-NP); y/o 2. mejor estabilidad en plasma en relación con los conjugados de apelina, más específicamente en relación con los conjugados de apelina descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 14/336,293 (PAT055781-US-NP) y/o en relación con los conjugados de ácidos grasos de apelina descritos
20 en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No 14/336 262 (PAT055418-US-NP).

 En un aspecto de modalidades 7A y 7B, la mejora de la estabilidad en plasma es de al menos 2 veces.

25 En la modalidad 7C, el conjugado de ácido graso de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 30 minutos. En otra modalidad, el conjugado de ácido graso de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 60 minutos. En otra modalidad, el conjugado de ácido graso de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 5 horas, preferiblemente al menos 10 horas y más preferiblemente 12 horas.

30

 En la modalidad 7D, los conjugados de ácido graso de apelina de la invención tienen una EC_{50} de menos de 400 nM. En otra modalidad, los conjugados de ácido graso de apelina de la invención tienen una EC_{50} de menos de 300 nM, preferiblemente menos de 200 nM y

más preferiblemente menos de 160 nM. En aún otra modalidad, los conjugados de ácido graso de apelina de la invención tienen una EC_{50} de menos de 100nM.

Los conjugados de ácidos grasos de apelina de la invención también abarcan
5 conjugados de ácido graso de apelina que son sustancialmente equivalentes a la misma. Los conjugados de ácidos grasos de apelina de la invención también abarcan conjugados que contienen péptidos apelina, los cuales son al menos aproximadamente 95 % idénticos a los péptidos según las Fórmulas I, o una amida, un éster o una sal de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de aminoácidos
10 homóloga", o variaciones de la misma, se refiere a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de aminoácidos de al menos un porcentaje especificado, y se usa indistintamente con la frase "identidad de secuencia". Las secuencias de aminoácidos homólogas incluyen aquellas secuencias de aminoácidos que contienen sustituciones de aminoácidos conservadoras y cuyos polipéptidos tienen la misma unión y/o actividad. En
15 algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos es homóloga si tiene al menos 60 % o más, hasta el 99 %, de identidad frente una secuencia comparable. En algunas modalidades, una secuencia de aminoácidos es homóloga si comparte una o más, hasta 60, sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos frente a una secuencia comparable. En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos homólogas tienen no más de 5 o no más de 3
20 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

La homología también puede ocurrir a nivel del polipéptido. El grado o porcentaje de identidad de los péptidos o polipéptidos de la invención, o porciones de los mismos, frente a diferentes secuencias de aminoácidos se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias dividido por la longitud de la "secuencia de la
25 invención" o la "secuencia extraña", cualquiera que sea menor. El resultado se expresa como el porcentaje de identidad.

Un conjugado que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con una homología de aproximadamente entre 80 y 99,9 %, preferiblemente entre 90 y 99,9 % frente a la secuencia de aminoácidos de Fórmula I, y que tiene una estabilidad en plasma
30 superior a la de la apelina-13 y/o la pir-1-apelina-13 y/o el péptido sin conjuguar correspondiente, entra en la categoría del conjugado de la invención.

Sin embargo, una variante conjugada que tiene un nivel un poco más bajo de actividad en relación con la apelina-13 y/o la pir-1-apelina-13 y/o el péptido no conjugado correspondiente puede ser considerada como una variante funcional y biológica, aunque

idealmente un conjugado biológicamente activo tiene propiedades biológicas similares o mejoradas con respecto a la apelina-13 y/o la pir-1-apelina-13 y/o el péptido no conjugado correspondiente.

5 El término "sustancialmente equivalente" significa que la naturaleza de la actividad de unión al receptor, la actividad de transducción de señales y similares son equivalentes. Por lo tanto, se admite la presencia de diferencias uniformes entre grados tales como la potencia de la actividad de unión al receptor y el peso molecular del polipéptido.

10 Un polipéptido tal como se describe en el presente documento, o un equivalente sustancial al mismo, por sustitución, delección, adición o inserción de uno o más de los aminoácidos se pueden mencionar como polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de secuencia de aminoácidos en este sentido. Un polipéptido tal como se describe en el presente documento, o un equivalente sustancial al mismo, mediante sustitución de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3, y más preferiblemente de 1 a 2 aminoácidos con aminoácidos
15 naturales o no naturales se pueden mencionar como polipéptidos que contienen un equivalente sustancial de secuencia de aminoácidos en este sentido. Preferiblemente, las 2 cisteínas que forman el puente disulfuro no se sustituyen. Otras modificaciones y alteraciones pueden incluir la sustitución de un L-aminoácido con un D-aminoácido, u otra variación, incluyendo, de manera enunciativa más no limitativa, fosforilación, carboxilación, alquilación
20 y similares, siempre y cuando se mantenga la actividad agonística de APJ del conjugado que comprende dicho péptido y mejore la estabilidad en plasma en relación con la forma piroglutamada de apelina-13 y/o mejore en relación con el péptido no conjugado correspondiente.

25 ***Preparación del péptido de Fórmula I:***

El péptido apelina de Fórmula I se puede producir usando cualquier proceso químico de síntesis o mediante métodos recombinantes o una combinación de ambos métodos. Los constructos de péptido-enlazador y los péptidos apelina se pueden preparar como de longitud completa o se pueden sintetizar como fragmentos de longitud no completa y unidos. El péptido
30 de la presente invención se puede producir a través los procedimientos ya conocidos para la síntesis de péptidos. Los métodos para la síntesis de péptidos pueden ser cualquiera de síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida. Por lo tanto, el péptido y polipéptido de interés se pueden producir mediante la condensación de un péptido o aminoácido parcial capaz de constituir la proteína con la parte residual del mismo y, cuando el producto tiene un grupo

protector, el grupo protector se separa, a partir de lo cual se puede fabricar un péptido deseado. Los métodos conocidos para la condensación y desprotección incluyen los procedimientos descritos en la siguiente bibliografía (1)-(5).

- 5 (1) M. Bodanszky y M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, Nueva York, 1966,
 (2) Schroeder y Luebke, The Peptide, Academic Press, Nueva York, 1965,
 (3) Nobuo Izumiya et al. Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975,
10 (4) Haruaki Yajima y Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977, y
 (5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.
- 15 Después de la reacción, el péptido se puede purificar y aislar mediante una combinación de técnicas de purificación convencionales, tales como extracción con disolvente, cromatografía en columna, cromatografía líquida y recristalización. Cuando el péptido aislado tal como se describió anteriormente es un compuesto libre, se puede convertir en una sal adecuada usando el método conocido. De manera inversa, cuando el producto aislado es una sal, se
20 puede convertir en el péptido libre usando el método conocido.

La amida de polipéptido se puede obtener usando una resina para síntesis de péptido adecuada para la amidación. La resina incluye resina de clorometilo, resina de hidroximetilo, resina de benzhidrilamina, resina de aminometilo, resina de alcohol 4-benciloxibencilo, resina
25 de 4-metilbenz-hidrilamina, resina de PAM, resina de 4-hidroximetilmetilfenilacetamidometil, resina de poliacrilamida, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, resina de 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi, resina de cloruro de 2-clorotritilo, y así sucesivamente. Usando una resina como estas, aminoácidos cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de la cadena lateral han sido protegidos adecuadamente se condensan en la resina de acuerdo
30 con la secuencia del péptido objetivo mediante diversas técnicas de condensación ya conocidas. Al final de la serie de reacciones, el péptido o el péptido protegido se retira de la resina y se eliminan los grupos protectores y, si es necesario, se forman enlaces disulfuro necesarios para obtener el polipéptido objetivo.

Para la condensación de los aminoácidos protegidos mencionados anteriormente, se puede usar una variedad de reactivos de activación para la síntesis de péptidos, tales como HATU, HCTU o, por ejemplo, una carbodiimida. La carbodiimida incluye DCC, N,N' - diisopropilcarbodiimida y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Para la activación con un reactivo como estos, se puede usar un aditivo inhibidor de la racemización, por ejemplo, HOBt u oxima (Oxyma Pure). El aminoácido protegido se puede añadir directamente a la resina junto con los reactivos de activación y el inhibidor de racemización o se puede pre-activar como anhídrido de ácido simétrico, éster de HOBt o éster HOOBt añadido luego a la resina. El disolvente para la activación de los aminoácidos protegidos o la condensación con la resina se puede seleccionar adecuadamente de entre los disolventes que se sabe son útiles para reacciones de condensación de péptidos. Por ejemplo, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, cloroformo, trifluoroetanol, sulfóxido de dimetilo, DMF, piridina, dioxano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetato de etilo, o mezclas adecuadas de los mismos.

La temperatura de reacción se puede seleccionar del rango que actualmente se sabe es útil para la formación de enlaces péptidos y, usualmente, se selecciona del intervalo entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente 50 °C. El derivado de aminoácido activado se usa generalmente en una proporción de 1,5-4 veces de excedente. Si se encuentra que la condensación es insuficiente mediante una prueba usando la reacción de ninhidrina, la reacción de condensación se puede repetir para lograr una condensación suficiente sin eliminar el grupo protector. Si la condensación repetida sigue sin proporcionar un grado suficiente de condensación, el grupo amino sin reaccionar puede ser acetilado con anhídrido acético o acetilimidazol.

El grupo protector del grupo amino para el aminoácido del material de partida incluye Z, Boc, terc-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, Cl-Z, Br-Z, adamantiloxicarbonilo, trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo, difenilfosfinotioil o Fmoc. El grupo protector de carboxi que se puede usar incluye, de manera enunciativa mas no limitativa, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈ y alquilo C₁₋₂ arilo C₆₋₁₀, así como 2-adamantilo, 4-nitrobencilo, 4-metoxibencilo, 4-clorobencilo, fenacilo, benciloxicarbonilhidrazido, terc-butoxicarbonilhidrazido y tritilhidrazido.

El grupo hidroxilo de serina y treonina se pueden proteger mediante esterificación o eterificación. El grupo adecuado para dicha esterificación incluye grupos derivados de carbono, tales como grupos alcanilo inferiores, por ejemplo, acetilo etc., grupos aroilo, por ejemplo, benzoilo etc., benciloxycarbonilo y etoxycarbonilo. El grupo adecuado para dicha eterificación incluye bencilo, tetrahidropiraniilo y butilo terciario. El grupo protector para el grupo hidroxilo fenólico de tirosina incluye Bzl, Cl₂-Bzl, 2-nitrobencilo, Br-Z y butilo terciario.

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

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

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

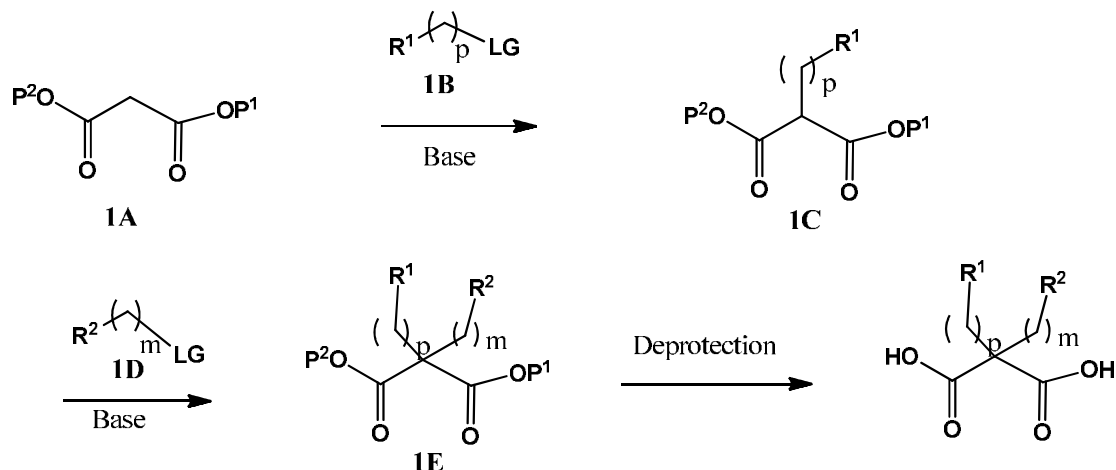
El método para proteger los grupos funcionales que no deben hacer parte de la reacción del material de partida, los grupos protectores que se pueden usar, el método de

eliminación de los grupos protectores y el método de activación de los grupos funcionales que participarán en la reacción se pueden seleccionar todos a criterio de entre los grupos y métodos conocidos.

- 5 Otro método para obtener la forma de amida del polipéptido comprende primero realizar la amidación del grupo carboxilo del aminoácido C-terminal, luego extender la cadena peptídica al N-lateral hasta alcanzar la longitud de cadena deseada y, a continuación, desproteger selectivamente el grupo α -amino del péptido C-terminal y el grupo α -carboxilo del aminoácido o péptido que formará el resto del polipéptido objetivo y condensar los dos
- 10 fragmentos cuyos grupo α -amino y grupos funcionales de la cadena lateral fueron protegidos con los grupos protectores adecuados mencionados anteriormente en un disolvente mixto, tal como se mencionó anteriormente. Los parámetros de esta reacción de condensación pueden ser los mismos que aquellos descritos anteriormente. Del péptido protegido obtenido mediante condensación, se eliminan todos los grupos protectores a través del método descrito
- 15 anteriormente con el proporcionar el péptido bruto deseado. Este péptido bruto se puede purificar mediante procedimientos de purificación conocidos y la fracción principal se puede liofilizar para proporcionar el polipéptido amidado objetivo. Para obtener un éster del polipéptido, el grupo α -carboxilo de un aminoácido C-terminal se condensa con un alcohol deseado para producir un éster de aminoácido y, a continuación, se sigue el procedimiento
- 20 descrito anteriormente para la producción de la amida.

Síntesis de las fracciones de ácido graso

El esquema 1 describe la síntesis de una fracción de ácido graso según la modalidad 1.



Esquema 1

donde P^1 y P^2 son grupos protectores de ácido carboxílico, tales como, por ejemplo, metilo, etilo, terc-butil, metoxibencilo, bencilo, benciloxi, metoximetilo, metiltiometo, tetrahidropiranilo, fenacilo, N-ftalimida, cinamilo, trifenilmetilo, 9-antrilmetilo, piperonilo, trimetilsililo, t-butildimetilsililo o 2-alkil-1,3-oxazolinis; donde LG es un grupo saliente tal como por ejemplo halógeno (por ejemplo, Br, Cl, I) o trifluorometanosulfonilo y donde R^1 es CH_3 y p es 10 o R^1 es $CH=CH_2$ y p es 9 y donde m es 10 y R^2 es CO_2H ; tal como se describe en la modalidad 1.

La alquilación de ácido malónico protegido (**1A**) con un agente alquilante (**1B**) en presencia de una base (por ejemplo, hidruro de sodio, carbonatos de potasio o de cesio, hidróxido de sodio, diisopropilamida de litio, bis(trimetilsilil)amida de sodio, bis(trimetilsilil)amida de potasio, tertametilpiperidida de litio, 1,8-diaazacicoundec-7-eno, N,N-diisopropiletilamina o 2,6-dit-butilputridina), en un disolvente tal como DMF, THF o dimetil acetamida, genera la fracción di-ácido protegida (**1C**).

La fracción di-ácido protegida (**1C**) se somete a una segunda alquilación con agente alquilante (**1D**) en condiciones básicas, tal como se describió anteriormente, con el fin de obtener el producto protegido dialquilado (**1E**). Los ácidos grasos de acuerdo con la modalidad 1 se obtienen mediante desprotección usando el método de desprotección apropiado. Se pueden aplicar métodos estándar para la hidrólisis del intermedio (**1E**) usando una base seleccionada de entre, de manera enunciativa mas no limitativa, NaOH, KOH o LiOH, o un

El ácido graso (**2B**) se puede conectar a un enlazador que contiene PEG (**2A**) usando reactivos de condensación de péptidos que incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, diciclohexilcarbodiimida (*DCC*), diisopropilcarbodiimida (*DIC*), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (*EDC HCl*), hexafluorofosfato de benzotriazol -1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (*PyBOP*), o hexafluorofosfato benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (*BOP*) en presencia o ausencia de un reactivo tal como 1-hidroxibenzotriazol, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol o dimetilaminopiridina. Preferiblemente, la funcionalidad de ácido de (**2B**) se convierte en su forma activada del mismo usando la química NHS antes de reaccionar con la funcionalidad amino del enlazador PEG (**2A**).

10

En presencia de funcionalidades carboxílicas adicionales tanto en el ácido graso y como en el enlazador PEG, los grupos protectores se pueden introducir antes de la reacción de acoplamiento con el fin de controlar el sitio reactivo. Los grupos protectores para el ácido carboxílico se describieron anteriormente en el Esquema 1. Alternativamente, la activación selectiva de ácido carboxílico se puede lograr usando la química NHS.

15

Ejemplos más específicos de síntesis de constructos de ácidos grasos-PEG se describen en la sección de experimentos que se encuentra más adelante y en la solicitud provisional No. 62/082327 (PAT056274-US-PSP2).

20

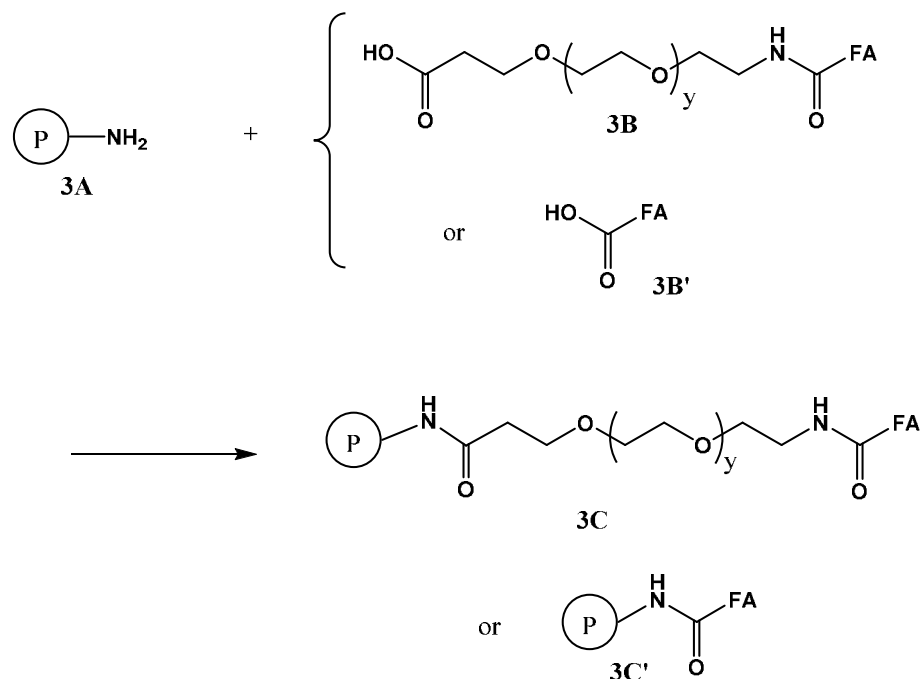
25

30

Preparación de conjugados

El Esquema 3 describe la conjugación del ácido graso o del constructo de ácido graso-PEG con la funcionalidad amino en el extremo N-terminal del péptido apelina de Fórmula I:

Conjugación a través de unión directa usando condiciones de acoplamiento



5

Esquema 3

donde P es el péptido apelina de Fórmula I y el ácido graso o el constructo de ácido graso-PEG se conecta al extremo N-terminal de la biomolécula, y en donde FA es tal como se definió anteriormente en el Esquema 2.

- 10 El constructo de ácido graso-enlazador (3B) o el ácido graso (3B') se conecta a un residuo amino del péptido (3A) (la funcionalidad amino del extremo N-terminal) a través de su grupo reactivo de ácido carboxílico usando métodos de acoplamiento de amida estándar. Métodos de acoplamiento conocidos se describen en detalle en el Esquema 2. Preferiblemente, la funcionalidad de ácido en el ácido graso (3B') o en el constructo de ácido
- 15 graso-PEG (3B) de activa usando la química NHS.

Condiciones experimentales más detalladas han sido descritas en la sección de experimentos que se encuentra más adelante en el presente documento y en la en la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/082327 (PAT056274-US-PSP2).

Composiciones farmacéuticas

El conjugado de la presente invención se puede administrar de cualquiera de una variedad de maneras, incluyendo por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, por inhalación, por vía intranasal, oral etc. Modalidades particularmente preferidas de la invención emplean la administración intravenosa continua de los conjugados de la presente invención, o de una amida, éster, o sal de los mismos. Otras modalidades preferidas de la invención emplean la administración subcutánea de los conjugados de la invención, o de una amida, éster o sal de los mismos.

Los conjugados de la presente invención se pueden administrar como un bolo o como una infusión continua durante un período de tiempo. Se puede usar una bomba implantable. En ciertas modalidades de la invención, los conjugados se administran de manera intermitente o continua durante uno o varios días (por ejemplo, 2-3 o más días), o durante períodos de tiempo más largos, por ejemplo, semanas, meses o años. En algunas modalidades, el conjugado se administra de manera intermitente o continua durante al menos aproximadamente 3 días. En otras modalidades, el conjugado se administra de manera intermitente o continua durante al menos aproximadamente una semana. En otras modalidades, el conjugado se administra de manera intermitente o continua durante al menos aproximadamente dos semanas. Puede ser deseable mantener una concentración media de conjugado en plasma por encima de un valor umbral particular, ya sea durante la administración o entre la administración de dosis múltiples. Una concentración deseable se puede determinar, por ejemplo, con base en la condición fisiológica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, etc. Dicho valor o valores deseables se pueden identificar realizando ensayos clínicos estándar. Alternativamente, los péptidos y conjugados de los mismos pueden ser administrados por vía oral a través del mecanismo de FcRn. (Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3; 3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente invención, o una amida, un éster o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica se puede formular para vías de administración específicas, tales como administración oral, administración parenteral y administración rectal, etc. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar en una forma sólida (incluyendo, de manera enunciativa mas no limitativa, cápsulas, tabletas, píldoras, gránulos, liofilizados, polvos o supositorios) o en forma líquida (incluyendo, de

manera enunciativa mas no limitativa, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a procedimientos farmacéuticos convencionales tales como fabricación aséptica, esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes, agentes formadores de sedimento, agentes de tonicidad, agentes lubricantes o
5 agentes tampón convencionales, así como adyuvantes, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y tampones, etc.

En ciertas modalidades, la composición farmacéutica es para administración subcutánea. Componentes para la formulación y métodos para administración subcutánea de proteína/polipéptidos adecuados son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Solicitud
10 de Patente de los Estados Unidos publicada No. 2011/0044977 y la Patente de Estados Unidos No. 8,465,739 y la Patente de Estados Unidos No. 8,476,239. Típicamente, las composiciones farmacéuticas para administración subcutánea contienen estabilizadores adecuados (por ejemplo, aminoácidos, tales como metionina, y/o sacáridos, tales como sacarosa), agentes tamponantes y agentes tonificantes.

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

20 Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ). o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida de tal manera que permita una fácil inyectabilidad. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben preservar de la acción
25 contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo pertinente puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula
30 requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr usando diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, aminoácidos, sorbitol, cloruro de sodio.

La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede generar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y se preparan supositorios según sea conveniente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan según métodos
10 convencionales de mezclado, granulación o revestimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente entre 0,1 y 75 %, o contienen aproximadamente entre 1 y 50 %, del ingrediente activo.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una
15 combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y otros ingredientes requeridos elegidos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos
20 preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, los cuales producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la que el
25 compuesto de la presente invención, como un ingrediente activo, se descompondrá. Dichos agentes, que se denominan en este documento como "estabilizadores", incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, antioxidantes como el ácido ascórbico, tampones de pH o tampones de sal, etc.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la eficacia y las propiedades de los conjugados de esta invención y que, por lo general, no son indeseables biológicamente o por cualquier otro motivo. En muchos casos, los conjugados de la presente invención tienen la capacidad

de formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos.

Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, 5 cloruro/hidrocloreuro, clorteoofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno 10 fosfato/dihidrógeno fosfato, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

15 Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar sales son, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maléico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables se pueden formar con 20 bases inorgánicas u orgánicas.

Las bases inorgánicas a partir de las cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la tabla periódica. En ciertas modalidades, las sales se derivan de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; en particular, las sales adecuadas incluyen amonio, potasio, sodio, calcio y sales 25 de magnesio.

Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas básicas de intercambio iónico, y similares. Ciertas aminas orgánicas adecuadas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, 30 dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto original, una fracción básica o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada

(por ejemplo, carbonato, bicarbonato, hidróxido de Na, Ca, Mg, K, o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, el uso de medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, es deseable siempre que sea posible. Listas de sales adecuadas adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington Pharmaceutical Sciences", 20a ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

Tal como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes tensioactivos, antioxidantes, conservantes (*por ejemplo*, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, y similares, y combinaciones de los mismos, tal como es de conocimiento de los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, Pp. 1289- 1329). Salvo que un vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Método de la invención:

La familia de péptidos apelina es la única familia natural conocida de ligandos para el receptor APJ acoplado a la proteína G. El gen de la apelina codifica un polipéptido de 77 aminoácidos, el cual se procesa en formas biológicamente activas de péptidos apelina, tales como apelina-36, apelina-17, apelina-16, apelina-13, apelina-12 y forma modificada de piroglutamato de apelina-13 (pir¹-apelin-13). Cualquiera de estos péptidos apelina, tras la unión al receptor APJ, transduce la señal a través de las proteínas Gi y Gq. En los cardiomiocitos, el acoplamiento con Gi o Gq produce cambios en el pH intracelular, la activación de PLC y la producción de IP3, lo que mejora la sensibilidad al calcio de los miofilamentos y, en última instancia, genera un aumento de la contractilidad cardíaca. El acoplamiento con Gi inhibe la producción de AMPc, adenilil ciclasa y Gs activada y aumenta los niveles de pAKT, lo cual conduce a la cardioprotección. En las células endoteliales vasculares, la activación de APJ a través de Gi, pAKT conduce a un aumento en la producción

de óxido nítrico (NO), lo que incrementa la relajación del músculo liso y da como resultado vasodilatación general.

Los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable tienen episodios agudos ocasionales de descompensación, donde la contractilidad cardíaca disminuye aún más y los síntomas empeoran. Estas exacerbaciones se conocen como insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ICAD). Las terapias actuales para la ICAD incluyen diuréticos, vasodilatadores y fármacos inotrópicos, los cuales aumentan la contractilidad cardíaca directamente. Los fármacos inotrópicos intravenosos actuales (dobutamina, dopamina, milrinona, levosimendán) son reconocidos por su relación con eventos adversos tales como arritmia y aumento de la mortalidad a largo plazo. Los análogos de conjugados de ácidos de ácidos grasos de apelina sintéticos de la presente invención proporcionan una terapia para ICAD que aumenta la contractilidad cardíaca sin riesgos arritmogénicos o de mortalidad, y podrían ser una solución para las importantes necesidades médicas no satisfechas relacionadas con la insuficiencia cardíaca crónica.

De hecho, el tratamiento agudo con apelina (5 min) en seres humanos produce vasodilatación coronaria y mejora el gasto cardíaco. Sin embargo, las apelinas inalteradas exhiben una vida media (de segundos) y una duración de acción *in vivo* (unos pocos minutos) muy cortas. Los potentes agonistas de APJ conjugados sintéticos de la presente invención tienen vidas medias más largas en comparación con la apelina inalterada y/o en comparación con los péptidos apelina sintéticos descritos anteriormente y/o los conjugados de ácidos grasos de apelina sintéticos tales como aquellos descritos en la Patente de Estados Unidos No 8,673,848 (Expediente No. PAT054961-US-NP) y la Solicitud de Patente de Estados Unidos 14/336,293 (PAT055781-US-NP), respectivamente.

La activación del receptor APJ en cardiomiocitos a) mejora la contractilidad cardíaca a través de Gi/Gq, PLC y Ca²⁺, y b) proporciona cardioprotección a través de la activación de Gi, pAKT, pero sin aumentar AMPc (como se observa con otros fármacos inotrópicos). Además, el agonismo de APJ en las células endoteliales conduce a la vasodilatación arterial, lo que es también beneficioso para la insuficiencia cardíaca al reducir la carga de trabajo del ventrículo derecho. Administrados en conjunto, los conjugados de la presente invención pueden mejorar la función cardíaca global, reducir la arritmogénesis y proporcionar beneficios de supervivencia.

Más recientemente, ha habido un número de publicaciones de investigación preclínica que estudian la posible participación de la apelina en la resistencia a la insulina y la diabetes. Se ha demostrado que la apelina 1) reduce los niveles de glucosa en sangre mejorando la

captación de glucosa en el músculo, tejido adiposo y el corazón, 2) protege las células beta pancreáticas del estrés ER y la posterior apoptosis, 3) disminuye la secreción de insulina en las células beta, y 4) regula la lipólisis inducida por catecolamina en el tejido adiposo. Se ha encontrado que la activación de la vía pAKT participa en estos procesos.

5 Los conjugados que comprenden polipéptido de Fórmula I, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, propiedades de agonismo del receptor APJ, por ejemplo, como se indica en las pruebas *in vitro* e *in vivo* tal como se expone en las secciones a continuación, por lo que están indicados para uso terapéutico.

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

Por lo tanto, en aún otra modalidad, la presente invención proporciona el uso de un
20 conjugado tal como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en el tratamiento de una enfermedad asociada a la actividad del receptor APJ. En una modalidad adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que responde al agonismo del receptor APJ. En otra modalidad, la enfermedad se selecciona del listado anteriormente mencionado, una insuficiencia cardíaca descompensada aguda
25 apropiada. En aún otro subconjunto de esta modalidad, la presente invención proporciona el uso de los conjugados tal como se describen en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a la actividad del receptor APJ.

Por lo tanto, como una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de
30 un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en terapia. En una modalidad adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que puede ser tratada mediante activación (agonismo) del receptor APJ.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad que responde al agonismo del receptor APJ, el cual comprende la administración de una cantidad

terapéuticamente aceptable de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad adicional, la enfermedad se selecciona del listado anteriormente mencionado, una insuficiencia cardíaca descompensada aguda apropiada.

5 En aun otro subconjunto de esta modalidad, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad que está asociada a la actividad del receptor APJ, el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 La cantidad eficaz de una composición farmacéutica o combinación de la invención a ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Por lo tanto, un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se está usando el conjugado, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y condición (la edad y estado de salud general) del paciente. De acuerdo con esto, el médico clínico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede variar desde aproximadamente 0,1 g/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras modalidades, la dosis puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o desde 1 µg/kg hasta 20 aproximadamente 100 mg/kg.

 La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de función dual en la formulación usada. Típicamente, un médico clínico administrará la composición hasta alcanzar una dosis que consiga el efecto deseado. Por consiguiente, la composición se puede administrar como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden 25 o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a través del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada es una tarea que los expertos en la técnica realizan de manera rutinaria y está dentro del ámbito de sus funciones normales. La dosificación apropiada se puede determinar usando datos de dosis-respuesta relevantes.

30 El término "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un conjugado de la presente invención se refiere a una cantidad del conjugado de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la disminución de un síntoma, el alivio de una condición, la desaceleración o el retraso del avance de una enfermedad, o la prevención de una enfermedad, etc. En una modalidad no limitante, el término "una cantidad

terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del bioconjugado de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para (1) aliviar, inhibir, prevenir y/o disminuir al menos parcialmente una condición, un trastorno o una enfermedad o un síntoma de los mismos (i) promovido por la activación del receptor APJ o (ii) asociado a la actividad del receptor APJ, o (iii) caracterizado por la actividad anormal del receptor APJ; o (2) activar el receptor APJ.

En otra modalidad no limitativa, el término "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del bioconjugado de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o a un tejido, o a un material biológico no celular, o a un medio, es eficaz para activar al menos parcialmente el receptor APJ. Como cualquier experto en la técnica podrá reconocer, la cantidad absoluta de un agente particular que es eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el agente que será administrado, el tejido blanco, etc. Un experto en la técnica entenderá que "una cantidad terapéuticamente eficaz" se puede administrar en una dosis única o se puede lograr mediante la administración de múltiples dosis. Por ejemplo, en el caso de un agente para tratar la insuficiencia cardíaca, una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para producir una mejora clínica del paciente, por ejemplo, una mayor tolerancia/capacidad para hacer ejercicio, el aumento de la presión arterial, una disminución en la retención de fluidos y/o mejores resultados en una prueba cuantitativa de funcionamiento cardíaco, por ejemplo, fracción de eyección, capacidad para hacer ejercicio (tiempo hasta el agotamiento), etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Usualmente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere a, por ejemplo, primates (*por ejemplo*, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas modalidades, el sujeto es un primate. En aún otras modalidades, el sujeto es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibir", "inhibición" o "que inhibe" se refiere a la reducción o supresión de una afección, síntoma o trastorno o enfermedad, o a una disminución significativa en la actividad basal de una actividad o proceso biológico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar", "que trata" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una modalidad a reducir la enfermedad o trastorno (es decir, desacelerar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra modalidad, "tratar" "para tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o reducir al menos un parámetro físico,

incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En aún otra modalidad, "tratar", "para tratar" o "tratamiento" se refiere a la modulación de la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, (*por ejemplo*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (*por ejemplo*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra modalidad, "tratar",
5 "para tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar el comienzo o el desarrollo o la progresión de la enfermedad o trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia, el comienzo o el desarrollo de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto como resultado de la administración de una terapia (*por ejemplo*,
10 un agente terapéutico) o la administración de una combinación de terapias (*por ejemplo*, una combinación de agentes terapéuticos).

En el presente documento, un sujeto "requiere o necesita" un tratamiento si dicho sujeto se puede beneficiar biológicamente, por razones médicas o en términos de su calidad
15 de vida, al recibir dicho tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, se debe interpretar que los términos "un", "una", "el/la" y términos similares usados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) incluyen tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o que el contexto haga
20 entender lo contrario.

Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o que el contexto haga entender claramente algo diferente. El uso de cualquier y todos los ejemplos, o de lenguaje ejemplar (*por ejemplo*, "tal como"), proporcionados en el presente
25 documento se debe entender meramente como una herramienta para aclarar la invención y no impone ningún tipo de limitación en el alcance de la invención, a menos que se exprese lo contrario.

La actividad de un conjugado de acuerdo con la presente invención se puede evaluar usando los siguientes métodos *in vitro* descritos a continuación.

30

Ensayo de flujo de calcio hAPJ:

Células estables Chem-5 APJ (Millipore # HTS068C) se sembraron en formato de 384 pozos con 10.000 células/pozo en 25 uL de medio de crecimiento, y luego se cultivaron 24 horas en una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C. Una hora antes del ensayo, se añadió

colorante de Calcio 4 FLIPR (Molecular Devices R8142) (25 uL/pozo) con probenecid (2,5 mM), y las células se incubaron una hora en una incubadora de cultivo de tejidos 37 °C. Bioconjugados se solubilizaron en HBSS, HEPES y tampón BSA al 0,1 %, y se diluyeron en serie 10 veces, entre 50 uM y 5 pM, por triplicado. FLIPR Tetra se usó para añadir
5 bioconjugados a las células con el colorante (1:5, para concentraciones finales de bioconjugado entre 10 uM y 1 pM). El colorante FLIPR dentro de las células emitió fluorescencia después de unirse al calcio, y la fluorescencia del exterior de las células fue enmascarada. La fluorescencia se midió usando excitación 470-495 y longitudes de onda de emisión 515-575 en FLIPR Tetra. Las lecturas se realizaron durante 3 minutos en total, a partir
10 de 10 segundos antes de la adición bioconjugado. Se calcularon los valores máximos y mínimos y se graficaron para cada concentración de bioconjugado, y se usó el software GraphPad Prism para calcular los valores CE_{50} en los puntos de inflexión de la curva, para estimulación de flujo de calcio mediante bioconjugados.

15 **Ensayo de estabilidad en plasma:**

Materiales:

Solución de trabajo: Se preparó artículo de prueba (1 mg/ml) en agua Milli-Q

Solución de extracción: Metanol:acetonitrilo:agua (1:1:1) con ácido fórmico al 0,1 % y Glyburide (400 ng/ml).

20 Plasma: Plasma de ratas macho Sprague Dawley (con heparina de sodio), comprada a Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

Sangre entera: Sangre entera de ratas macho Sprague Dawley (con heparina de sodio), comprado a Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

Homogeneizado de pulmón: Se adquirió pulmón de ratas macho Sprague Dawley de
25 Bioreclamation LLC (Liverpool, NY). El pulmón se homogeneizó usando un homogeneizador Polytron después de añadir 5x volumen de 1X PBS. El homogeneizado se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 3000 rpm durante 30 min para producir un sobrenadante claro. La concentración de proteínas se determinó usando un kit disponible en el mercado (Pierce, Thermo Scientific).

30

Procedimiento de preparación de las muestras: (péptidos)

El artículo de prueba se preparó en una de las siguientes matrices biológicas: plasma de rata heparinizado, sangre entera de rata heparinizada u homogeneizado de pulmón. La muestra de plasma y sangre entera se preparó a 5000 ng/ml añadiendo 5 uL de solución de

trabajo a una concentración de 1 mg/ml a 995 uL de plasma o sangre entera de rata. Muestras de homogeneizado de pulmón se prepararon diluyendo homogeneizado de pulmón a una concentración de proteína de 1 mg/ml con tampón fosfato salino (PBS), y luego se añadieron 5 uL de solución de trabajo a 995 uL de homogeneizado de pulmón diluido. Las muestras se incubaron a 37°C con agitación suave (65~75rpm) en una incubadora de baño de agua. En los puntos de tiempo 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 and 240 min, alícuotas (25 uL) de muestras de incubación se transfirieron a placas de 96 pozos e inmediatamente se sometieron a precipitación proteica usando 150 uL de solución de extracción. Una vez terminado el experimento de incubación, la placa de muestras se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se usó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes a otra placa y se añadieron 50 uL de agua a todas las muestras. La placa se agitó en vórtex antes del análisis LC-MS.

Procedimiento de preparación de las muestras (conjugados)

El artículo de prueba se preparó a 50.000 ng/ml añadiendo 5 uL de 1mg/ml de solución de trabajo a 495 uL de plasma de rata. Las muestras se incubaron a 37°C con agitación suave (65~75rpm) en una incubadora de baño de agua. En los puntos de tiempo 0 horas, 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 y 24 horas, alícuotas (50 uL) de muestras de incubación se transfirieron a placas de 96 pozos y se añadieron 100 uL 40 mM TCEP (tris(2-carboxietil) fosfina) a cada muestra. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Una vez terminada la reacción, se llevó a cabo la precipitación de proteínas usando 300 uL de acetonitrilo. La placa de muestras se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se usó un dispositivo de pipeteado (Tecan Temo) para transferir los sobrenadantes (125 uL) a otra placa y se añadieron 50 uL de a para todas las muestras. La placa se agitó en vórtex antes del análisis LC-MS.

25 Análisis LC-MS de muestras de estabilidad

HPLC: Agilent 1290 HPLC con automuestreador

Columna: MAC-MOD ACE C18, 3 µm, 30 mm x 2,1 mm i.d.

Fase móvil A: El ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo

Fase móvil B: El ácido fórmico al 0,1 % en agua

30 Programa de gradiente:

Tiempo (min)	Flujo (ml)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
1.5	0.4	5	95

4.1	0.4	5	95
4.2	0.4	95	5
5	0.4	95	5

5 Espectrómetro de masas: Agilent Q-TOF 6530

Modo de adquisición de datos: Análisis completo con rango de masas de 100 - 1000 m/z

Software de adquisición y análisis de datos: MassHunter

Análisis de datos:

- 10 Ensayo de estabilidad: estabilidad de vida media, ($t_{1/2}$), los valores se determinaron convirtiendo las áreas pico en cada punto de tiempo a porcentaje restante con respecto al área pico inicial ($t = 0$).

Porcentaje restante = $100 \times (\text{área del pico de la muestra}) \div (t = 0 \text{ área del pico})$

- 15 El logaritmo natural de los valores de porcentaje restante se calculó y se graficaron en relación con el tiempo de la muestra (Microsoft Excel). La pendiente de esta línea, k, se determinó mediante regresión lineal (Microsoft Excel).

Luego, la estabilidad de la vida media se calculó mediante la fórmula, $t_{1/2} = 0,693 \div k$

Ensayo de estabilidad en plasma con base en actividad sustitutiva:

- 20 Se siguió el protocolo de flujo de calcio descrito anteriormente, con los siguientes cambios. Los péptidos también se incubaron con plasma de rata al 5 % (Bioreclamation # RATPLNAHP-M, tratado con heparina de Na). Se tomaron lecturas en los puntos de tiempo t_0 y t_{24} horas, después de la incubación en una incubadora de cultivos de tejido a 37 °C. La vida media en plasma del péptido en minutos se estimó haciendo los siguientes cálculos:

- 25 1) $\text{LN}((\text{EC}_{50} \text{ a } t_0) / (\text{EC}_{50} \text{ a } t_{24} \text{ horas}))$,
 2) Cálculo de la pendiente del valor anterior y
 3) $t_{1/2} = 0,693 / (\text{pendiente}^2)$.

Tabla 1: Actividad y estabilidad de los conjugados

Bioconjugado	APJh Ca^{2+} Flux EC_{50} [nM]	Estabilidad en plasma con base en actividad sustitutiva $t_{1/2}$ [min]
Ejemplo 1	111,2	> 1000
Ejemplo 2	84,8	> 1000
Ejemplo 3	115.1	> 1000
Ejemplo 4	157,9	> 1000

pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH (péptido cíclico no conjugado - Ejemplo 8 de WO2013/111110	1.0	132
Ejemplo comparativo: Pir-1-apelina-13	6.6	5.0

Tabla 2: Correlación entre el ensayo de estabilidad en plasma y el ensayo de estabilidad en plasma con base en actividad sustitutiva:

Conjugado	Estabilidad en plasma t _{1/2} [min]	Ensayo de estabilidad en plasma con base en actividad sustitutiva t _{1/2} [min]
Pir-1-apelina-13	6.6	5.0
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH (Análogo cíclico no fusionado - Ejemplo 8 de WO2013/111110	163	132

5

Los protocolos y datos para evaluación farmacocinética in vivo vía dosificación SC.

Formulación, dosificación y adquisición de muestras:

El Ejemplo 1 y el Ejemplo 4 se disolvieron a una concentración de 0,1 mg/ml en PEG300 al 30 % (p/v) y dextrosa en PBS al 5 % (w/v). Ratones C57/B6 (~20 semanas de edad) fueron dosificados con el compuesto disuelto a través de inyección subcutánea (SC) en el costado (n = 4 por compuesto). El volumen de inyección fue de 10 ml kg. Se extrajeron muestras de sangre de la vena safena a las 3 y 6 horas después de aplicar la dosis, así como 1, 2, 4, 7 y 10 días después de aplicar la dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente a 4000 x g durante 10 min. El sobrenadante de plasma (10 µL) se transfirió a una placa de 96 pozos y se congeló a -80 °C hasta su análisis.

El Ejemplo 8 de WO2013/111110 se disolvió en agua estéril para inyección (Hospira) a una concentración de 1 mg/ml. Ratones C57/B6J (~22 semanas de edad) fueron dosificados con el compuesto disuelto a través de inyección subcutánea (SC) (n = 4). Se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de haber administrado la inyección. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente y luego el

sobrenadante de plasma se transfirió a una placa de 96 pozos y se congeló a -80 °C hasta su análisis.

Preparación de las muestras para el bioanálisis:

Se obtuvo una muestra previamente pesada de cada compuesto (1-3 mg) y se disolvieron a 1 mg/ml en DMSO. Estas se diluyeron en serie en plasma de ratón (BioReclamation) a concentraciones finales de 10.000, 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10, 5 y 1 ng/ml para construir una curva estándar para el análisis.

Las muestras de plasma de los estudios PK se descongelaron y se diluyeron hasta un volumen total de 25 µL añadiendo plasma de ratón.

Alícuotas (25 µL) de cada muestra y una muestra de la curva estándar se dispusieron en una placa de 96 pozos. Acetonitrilo (150 µL) con gliburida (100 ng/ml) como estándar interno se añadió a cada muestra y las muestras se agitaron en vórtex durante 30 segundos. Luego, las muestras se centrifugaron a 4000 x g durante 10 minutos. Después, se transfirió sobrenadante (125 µL) a una placa de 96 pozos fresca. Se añadieron y se mezclaron 50 µL de agua por agitación en vórtex durante 30 segundos.

Bioanálisis LC/MS (Agilent 1290):

Las muestras (10 µL) se transfirieron a HPLC usando un automuestreador CTC PAL. La columna LC fue ACE C18 30 x 2,1 mm, esfera de 3,0 µm. Se usó un sistema de disolvente binario con Disolvente A, el cual consistía en ácido fórmico al 0,1 % en agua, y Disolvente B, el cual consistía en ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. Las muestras se cargaron en la columna en Disolvente A al 95 % (0 a 0,5 min) y se eluyeron mediante un gradiente de Disolvente B entre 5 % y 50 % (0,5 a 1,8 min) y disolvente B entre 50 % y 98 % durante 1,8 a 2,3 min. La columna se mantuvo en Disolvente B al 98 % entre 2,3 y 2,9 min y regresó a Disolvente A al 95 % durante 2,9 a 3,0 min con equilibrado de la columna con Solvente A al 95 % durante 3,0 a 3,5 min. La tasa de flujo del disolvente fue 700 µL/min y la temperatura de columna fue 50°C.

Resultados: Los perfiles de exposición plasmática de ratones del compuesto de los Ejemplos 1 y 4 después de la administración de dosis por vía subcutánea se muestran en la Figura 1 y las vidas medias se resumen en la Tabla 3;

Compuesto	t½ [h]
Ejemplo 1	43
Ejemplo 4	23
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH (Análogo cíclico no fusionado - Ejemplo 8 de WO2013/111110)	0.52

Tabla 3

El conjugado de la presente invención puede tener una potencia de receptor APJ similar a la de la apelina-13 o la pir-1-apelina-13. En una modalidad, el bioconjugado de la presente invención tiene una EC_{50} de menos de 400 nM. En otra modalidad, los conjugados de ácido graso de apelina de la invención tienen una EC_{50} de menos de 300 nM, 5 preferiblemente menos de 200 nM y más preferiblemente menos de 160 nM. En aún otra modalidad, el bioconjugado de la invención tienen una EC_{50} de menos de 100nM.

Los conjugados de la presente invención tienen una estabilidad en plasma superior a la de la apelina-13 o la pir-1-apelina-13 y/o superior a la del conjugado análogo Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (o *pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*) y/o superior a conjugados de ácidos grasos-apelina descritos anteriormente (Ejemplo 20 de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 14/336,290 (PAT055781-US-NP). En una modalidad, la mejora de la estabilidad en plasma es de al menos 2 veces. En una modalidad, la mejora de la estabilidad en plasma es de al menos 10 veces. En una modalidad, el conjugado de ácido graso de la invención 15 tiene una estabilidad en plasma de al menos 30 minutos o al menos 60 minutos. En otra modalidad, el conjugado de ácido graso de la invención tiene una estabilidad en plasma de al menos 5 horas, preferiblemente al menos 10 horas y más preferiblemente 12 horas.

El conjugado de la presente invención se puede administrar ya sea simultáneamente con, o antes o después, uno o más agentes terapéuticos adicionales. El conjugado de la 20 presente invención se puede administrar por separado, por la misma vía o por diferente vía de administración, o junto en la misma composición farmacéutica de los agentes adicionales.

En una modalidad, la invención proporciona un producto que comprende un conjugado de cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 25 y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. En una modalidad, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o afección que responde a la activación del receptor APJ.

Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende un conjugado de cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una 30 sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el o los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o un conjugado de cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el o los otros agentes terapéuticos de manera separada, *por ejemplo*, en forma de un kit.

En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro u otros agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable,
5 como se describió anteriormente.

En una modalidad, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una modalidad, el kit comprende medios para retener por separado dichas
10 composiciones, tales como un recipiente, un frasco dividido o un paquete de aluminio dividido. Un ejemplo de dicho kit es un envase blíster, como los que se usan típicamente para el envasado de comprimidos, cápsulas y similares.

El kit de la invención se puede usar para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes
15 intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas entre sí. Para facilitar el uso correcto, el kit de la invención generalmente incluye instrucciones para la administración.

En las terapias de combinación de la invención, el conjugado de la invención y el otro agente terapéutico pueden ser fabricados y/o formulados por los mismos fabricantes o por fabricantes diferentes. Adicionalmente, el conjugado de la invención y el otro agente
20 terapéutico se pueden juntar en una terapia de combinación. (i) antes de la entrega del producto combinado a los médicos (*por ejemplo*, en el caso de un kit que comprende el conjugado de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la dirección de un médico) poco antes de la administración; (iii) por los pacientes mismos, *por ejemplo*, durante la administración secuencial del conjugado de la invención y el otro agente
25 terapéutico.

Así, la invención proporciona el uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, donde el medicamento se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención
30 también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor de apelina, donde el medicamento se administra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7 para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, donde el conjugado se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, donde el otro agente terapéutico se administra con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención también proporciona el uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, donde el paciente ha sido tratado previamente (*por ejemplo*, durante las 24 horas anteriores) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección que responde al agonismo del receptor APJ, donde el paciente ha sido tratado previamente (*por ejemplo*, durante las 24 horas anteriores) con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, el otro agente terapéutico se selecciona de entre inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de reductasa HMG-Co-A, antagonistas de receptores de angiotensina II, enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueadores de canales de calcio (BCC), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, imitadores de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de aldosterona, bloqueadores de receptores de endotelina, inhibidores de aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y un inhibidor de NEP.

El término "en combinación con" un segundo agente o tratamiento incluye la co-administración del conjugado de la invención (*por ejemplo*, un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un conjugado descrito de otra manera en el presente documento) con el segundo agente o tratamiento, la administración del compuesto de la invención primero, seguido por el segundo agente o tratamiento, y la administración del segundo agente o tratamiento primero, seguido por el conjugado de la invención.

El término "segundo agente" incluye cualquier agente conocido en la técnica para el tratamiento, prevención o reducción de los síntomas de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un trastorno o enfermedad que responde a la

activación del receptor APJ, como por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

Ejemplos de segundos agentes incluyen inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de reductasa HMG-Co-A, antagonistas de receptores de angiotensina II, enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueadores de canales de calcio (BCC), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, imitadores de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de aldosterona, bloqueadores de receptores de endotelina, inhibidores de aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y un inhibidor de NEP.

Los inotrópicos, tal como se usan en el presente documento, incluyen, por ejemplo, dobutamina, isoproterenol, milrinona, amirinona, levosimendán, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol y digoxina.

Los bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos del presente documento incluyen, por ejemplo, acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, carteolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol.

Los anticoagulantes, tal como se usa en el presente documento, incluyen dalteparina, danaparoid, enoxaparina, heparina, tinzaparina, warfarina.

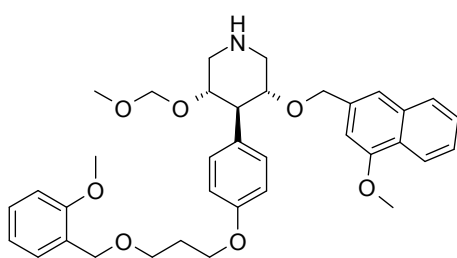
El término "inhibidor de HMG-Co-A reductasa" (también llamado inhibidor de beta-hidroxi-beta-metilglutaril-co-enzima-A reductasa) incluye agentes activos que se pueden usar para reducir los niveles de lípidos, incluyendo colesterol en sangre. Los ejemplos incluyen atorvastatina, cerivastatina, compactina, dalvastatina, dihidrocompactina, fluindostatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, mevastatina, pravastatina, rosuvastatina, rivastatina, simvastatina, y velostatina, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "inhibidor de ECA" (también llamado inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina) incluye moléculas que interrumpen la degradación enzimática de la angiotensina I en angiotensina II. Dichos compuestos se pueden usar para la regulación de la presión arterial y para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Los ejemplos

incluyen alacepril, benazepril, benazeprilato, captopril, ceronapril, cilazapril, delapril, enalapril, enaprilat, fosinopril, imidapril, lisinopril, moexipril, moveltopril, perindopril, quinapril, ramipril, espirapril, temocapril y trandolapril, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

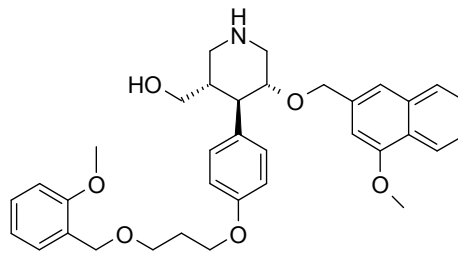
El término "antagonista de endotelina" incluye bosentán (cf. EP 526708 A), tezosentán (cf. WO 96/19459), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "inhibidor de renina" incluye ditekireno (nombre químico: [1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-dimetiletoxi)carbonil]-L-proli I-L-fenilalanil-N-[2-hidroxi-5-metil-1-(2-metilpropil)-4-[[[2-metil-1-[(2-piridinilmetil)amino]carbonil]butil]amino]carbonil]hexil)-N-alfa-metil-L-histidinamida); terlakireno (nombre químico: [R-(R*,S*)]-N-(4-morfolinilcarbonil)-L-fenilalanil-N-[1-(ciclohexilmetil)-2-hidroxi-3-(1-metiletoxi)-3-oxopropil]-S-metil-L-cisteineamida); aliskireno (nombre químico: (2S,4S,5S,7S)-5-amino-N-(2-carbamoil-2,2-dimetiletil)-4-hidroxi-7-[[4-metoxi-3-(3-metoxipropoxi)fenil]metil]-8-metil-2-(propan-2-il)nonanamida) y zankireno (nombre químico: [1S-[1R*(R*),2S*,3R*]]-N-[1-(ciclohexilmetil)-2,3-dihidroxi-5-metilhexil]-alfa-[[2-[[[4-metil-1-piperazinil]sulfonil]metil]-1-oxo-3-fenilpropil]-amino]-4-tiazolpropanamida), o sales de hidrocloreto de los mismos, o SPP630, SPP635 y SPP800 tal como los desarrolló Speedel, o RO 66-1132 y RO 66-1168 de Fórmula (A) and (B):



(A)

y



(B)

, o sales

farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "aliskireno", si no se define específicamente, se debe entender tanto como la base libre y como una sal de la misma, especialmente una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, más preferiblemente una sal hemi-fumarato de la misma.

El término "bloqueador de canales de calcio (BCC)" incluye dihidropiridinas (DHP) y no dihidropiridinas (no-DHP) (por ejemplo, BCC de tipo diltiazem y de tipo verapamilo). Los ejemplos incluyen amlodipina, bepridilo, diltiazem, felodipino, riosidina, isradipina, lacidipina, nicardipina, nifedipina, niguldipina, niludipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, verapamilo y nivaldipino, y es preferiblemente un representante no DHP seleccionado del grupo que consiste en flunarizina, prenilarina, diltiazem, fendilina, galopamilo, mibefradilo, anipamilo,

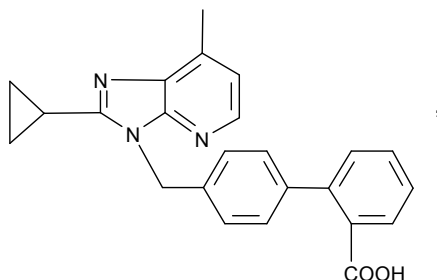
tiapamilo y verapamilo, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Se pueden usar BCC como fármacos anti-hipertensivos, anti-angina de pecho o antiarítmicos.

El término "diurético" incluye derivados de tiazida (*por ejemplo*, clorotiazida, hidroclorotiazida, metilclotiazida y clorotalidona).

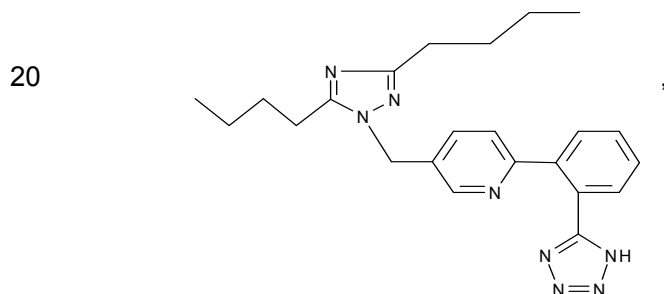
- 5 El término "imitador de ApoA-I" incluye péptidos D4F (*por ejemplo*, formula D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)

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

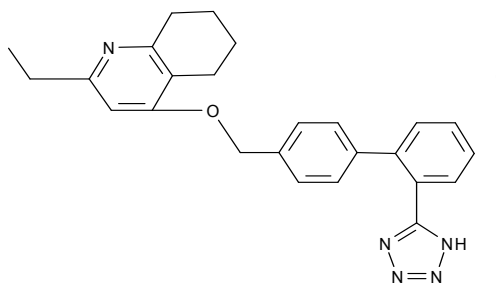
- La clase de antagonistas del receptor AT₁ comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales. Los esencialmente preferidos son los no peptídicos.
15 Por ejemplo, se pueden mencionar compuestos que se seleccionan del grupo que consiste de valsartán, losartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, saprisartán, tasosartán, telmisartán, el compuesto con la designación E-1477 de la siguiente fórmula



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



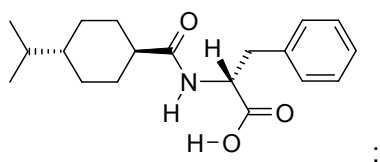
y el compuesto con la designación ZD-8731 de la siguiente fórmula



o, en cada caso, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Antagonistas del receptor AT₁ preferidos son candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, telmisartán, valsartán. También se prefieren aquellos agentes que están disponibles
5 en el mercado. El más preferido es el valsartán o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "agente antidiabético" incluye potenciadores de secreción de insulina que promueven la secreción de insulina a partir de células β-pancreáticas. Los ejemplos incluyen derivados de biguadina (*por ejemplo*, metformina), sulfonilureas (SU) (*por ejemplo*,
10 tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-cloro-N-[(1-pirolidinilamino)carbonil]-benzensulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), gliclazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepid, glibutiazol, glibuzol, glihexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida y toliciclamida), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Ejemplos adicionales incluyen derivados de
15 fenilalanina (*por ejemplo*, nateglinida [*N*-(*trans*-4-isopropilciclohexilcarbonil)-*D*-fenilalanina] (cf. EP 196222 and EP 526171) de la fórmula



repaglinida [ácido (S)-2-etoxi-4-{2-[[3-metil-1-[2-(1-piperidinil)fenil]butil]amino]-2-oxoetil}benzoico] (cf. EP 589874, EP 147850 A2, en particular el Ejemplo 11 en la página 61,
20 y EP 207331 A1); calcio (dihidrato de 2S)-2-bencil-3-(*cis*-hexahidro-2-isoindolinlicarbonil)-propionato (*por ejemplo*, mitiglinida (cf. EP 507534)); y glimepirida (cf. EP 31058).

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

DPP-IV es responsable de inactivar GLP-1. Más particularmente, DPP-IV genera un
25 antagonista del receptor de GLP-1 y de ese modo acorta la respuesta fisiológica a GLP-1.

GLP-1 es un importante estimulador de la secreción de insulina del páncreas y tiene efectos beneficiosos directos en la eliminación de glucosa.

El inhibidor de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) puede ser peptídico o, preferiblemente, no peptídico. Los inhibidores de DPP-IV son, en cada caso, divulgados de manera genérica y de manera específica, *por ejemplo*, en WO 98/19998, DE 196 16 486 A1, WO 00/34241 y WO 95/15309, en cada caso en particular, las reivindicaciones de compuestos y los productos finales de los ejemplos de trabajo, el objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incluyen en la presente solicitud a manera de referencia a estas publicaciones. Se prefieren aquellos compuestos que se divulgan específicamente en el Ejemplo 3 del documento WO 98/19998 y en el Ejemplo 1 del documento WO 00/34241, respectivamente.

GLP-1(péptido-1 de tipo glucagón) es una proteína insulínica que se describe, *por ejemplo*, por W.E. Schmidt et al. en Diabetologia, 28, 1985, 704-707 y en US 5,705,483.

El término "agonistas de GLP-1" incluye variantes y análogos de GLP-1 (7-36) NH₂, los cuales se divulgan, en particular, en US 5,120,712, US 5,118,666, US 5,512,549, WO 91/11457 y por C. Orskov et al en J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826. Ejemplos adicionales incluyen GLP-1(7-37), en cuyo compuesto la funcionalidad amida del carboxi-terminal de Arg³⁶ se desplaza con Gly en la 37^a posición de la molécula GLP-1(7-36)NH₂ y variantes y análogos de la misma, incluyendo GLN⁹-GLP-1(7-37), D-GLN⁹-GLP-1(7-37), acetil LYS⁹-GLP-1(7-37), LYS¹⁸-GLP-1(7-37) y, en particular, GLP-1(7-37)OH, VAL⁸-GLP-1(7-37), GLY⁸-GLP-1(7-37), THR⁸-GLP-1(7-37), MET⁸-GLP-1(7-37) y 4-imidazopropionil-GLP-1. También se da especial preferencia al análogo de agonista de GLP exendin-4, descrito por Greig *et al.* en Diabetologia 1999, 42, 45-50.

También se incluyen en la definición de "agente antidiabético" los potenciadores de la sensibilidad a la insulina que restauran la función deteriorada del receptor de insulina para reducir la resistencia a la insulina y por lo tanto aumentar la sensibilidad a la insulina.

Ejemplos incluyen derivados de tiazolidinediona hipoglucémica (*por ejemplo*, glitazona, (S)-((3,4-dihidro-2-(fenil-metil)-2H-1-benzopiran-6-il)metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-{{4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxopropil)-fenil}-metil}-tiazolidina-2,4-diona (darglitazona), 5-{{4-(1-metil-ciclohexil)metoxi}-fenil}metil}-tiazolidina-2,4-diona (ciglitazona), 5-{{4-(2-(1-indolil)etoxi)fenil}metil}-tiazolidina-2,4-diona (DRF2189), 5-{{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-etoxi]}bencil}-tiazolidina-2,4-diona (BM-13.1246), 5-(2-naptilsulfonil)-tiazolidina-2,4-diona (AY-31637), bis{4-[(2,4-dioxo-5-tiazolidinil)metil]fenil}metano (YM268), 5-{{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-2-hidroxietoxi]}bencil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-{{4-(1-fenil-1-

ciclopropanecarbonilamino)-bencil]-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-[[4-(2-(2,3-dihidroindol-1-il)etoxi)fenil]metil]-tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-chloro-fenil)]-2-propinil]-5-fenilsulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-[3-(4-chlorofenil)]-2-propinil]-5-(4-fluorofenil-sulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-[[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)fenil]metil]-tiazolidina-2,4-diona (rosiglitazona), 5-[[4-(2-(5-etil-2-piridil)etoxi)fenil]-metil]tiazolidina-2,4-diona (pioglitazona), 5-[[4-((3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2*H*-1-benzopiran-2-il)metoxi)-fenil]-metil]-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-[6-(2-fluoro-benciloxi)naptalen-2-ilmetil]-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-[[2-(2-naptil)-benzoxazol-5-il]-metil]tiazolidina-2,4-diona (T-174) and 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-(4-trifluorometil-bencil)benzamida (KRP297)).

Agentes antidiabéticos adicionales incluyen, moduladores de la vía de señalización de insulina, tales como inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa (PTPasas), compuestos miméticos de moléculas pequeñas antidiabéticos e inhibidores de la glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT); compuestos que influyen en una producción desregulada de glucosa hepática, tales como inhibidores de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BPasa), inhibidores de la glucógeno fosforilasa (GP), antagonistas del receptor de glucagón e inhibidores de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK); inhibidores de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK); inhibidores de vaciamiento gástrico; insulina; inhibidores de GSK-3; agonistas del receptor retinoide X (RXR); agonistas de Beta-3 AR; agonistas de proteínas de desacoplamiento (UCP); agonistas tipo no glitazona PPAR γ ; agonistas PPAR α / PPAR γ duales; compuestos que contienen vanadio antidiabético; hormonas incretinas, tales como péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) y agonistas de GLP-1; antagonistas del receptor de imidazolina de células beta; miglitol; antagonistas α_2 -adrenérgicos; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una modalidad, la invención proporciona una combinación, en particular una combinación farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 7D, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes terapéuticamente activos seleccionados de entre β bloqueadores de receptores adrenérgicos, tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, metoprolol, nadolol, propranolol, sotalol y timolol; antagonistas del receptor de la angiotensina II, tales como bloqueadores AT1; agentes antidiabéticos, tales como inhibidores de DPPIV (por ejemplo, vildagliptina) y agonista del péptido GLP1.

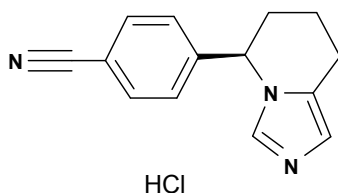
El término "agente reductor de la obesidad" incluye inhibidores de la lipasa (*por ejemplo*, orlistato) y supresores del apetito (*por ejemplo*, sibutramina y fentermina).

Un inhibidor de la aldosterona sintasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se entiende como un ingrediente activo que tiene la propiedad de inhibir la producción de aldosterona. La aldosterona sintasa (CYP11B2) es una enzima mitocondrial citocromo P450 que cataliza el último paso de la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal, es decir, la conversión de 11-desoxicorticosterona a aldosterona. Se sabe que la inhibición de la producción de aldosterona con inhibidores llamados inhibidores de la aldosterona sintasa es una variante exitosa para el tratamiento de hipocalemia, la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, la fibrilación auricular o la insuficiencia renal. Los expertos en la técnica podrán detectar fácilmente dicha actividad de inhibición de la aldosterona sintasa usando ensayos convencionales (*por ejemplo*, US 2007/0049616).

La clase de inhibidores de aldosterona sintasa comprende inhibidores de la aldosterona sintasa esteroideos y no esteroideos, aunque los últimos son los más preferidos.

Se da preferencia a los inhibidores de la aldosterona sintasa disponibles en el mercado o los inhibidores de la aldosterona sintasa aprobados por las autoridades sanitarias.

La clase de inhibidores de la aldosterona sintasa comprende compuestos que tienen diferentes características estructurales. Un ejemplo de inhibidor de aldosterona sintasa no esteroideo es el (+)-enantiómero del clorhidrato de fadrozol (patentes de Estados Unidos 4617307 y 4889861) de fórmula



o, cuando sea apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos divulgados de manera genérica y de manera específica, por ejemplo, en US2007/0049616, en particular en las reivindicaciones de compuestos y los productos finales de los ejemplos de trabajo, el objeto de los productos finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones se incluyen en la presente solicitud a manera de referencia a esta publicación. Los inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados para uso en la presente invención preferidos incluyen, de manera enunciativa más no limitativa, 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-metilbenzonitrilo; (4-metoxibenzil)metilamida de ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; 4'-fluoro-6-(6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo; éster butílico de ácido 5-(4-ciano-2-metoxifenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-

c]imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-2-metoxibenzonitrilo; éster 4-fluorobencílico de ácido 5-(2-cloro-4-cianofenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; éster metílico de ácido 5-(4-ciano-2-trifluorometoxifenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; éster 2-isopropoxietílico de ácido 5-(4-ciano-2-metoxifenil)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-carboxílico; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-2-metilbenzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-3-fluorobenzonitrilo; 4-(6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)-2-metoxibenzonitrilo; 3-fluoro-4-(7-metileno-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-5-il)benzonitrilo; *cis*-3-fluoro-4-[7-(4-fluorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,5-*a*]pyridin-5-il]benzonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo; 4'-fluoro-6-(9-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-imidazo[1,5-*a*]azepin-5-il)bifenil-3-carbonitrilo, o en cada caso, el enantiómero (R) o (S) del mismo; o cuando sea apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

Otros inhibidores de la aldosterona sintasa también incluyen compuestos y análogos divulgados en las solicitudes de patente de Estados Unidos US2007/0225232, US2007/0208035, US2008/0318978, US2008/0076794, US2009/0012068, US20090048241 y en las solicitudes PCT WO2006/005726, WO2006/128853, WO2006128851, WO2006/128852, WO2007065942, WO2007/116099, WO2007/116908, WO2008/119744 y en la Patente Europea EP 1886695. Los inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados para uso en la presente invención preferidos incluyen, de manera enunciativa más no limitativa, 8-(4-fluorofenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazina; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)-2-fluorobenzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)-2,6-difluorobenzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)-2-metoxibenzonitrilo; 3-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)ftalonitrilo; 4-(8-(4-cianofenil)-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)benzonitrilo; 4-(5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazin-8-il)naftaleno-1-carbonitrilo; 8-[4-(1*H*-tetrazol-5-il)fenil]-5,6-dihidro-8*H*-imidazo[5,1-*c*][1,4]oxazina, desarrollados por Speedel, o en cada caso, el enantiómero (R) o (S) del mismo; o cuando sea apropiado, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los inhibidores de la aldosterona sintasa útiles en dicha combinación son compuestos y análogos divulgados de manera genérica y de manera específica, por ejemplo, en WO 2009/156462 y WO 2010/130796, en particular en las reivindicaciones de compuestos y los productos finales de los ejemplos de trabajo, el objeto de los productos

5 finales, las preparaciones farmacéuticas y las reivindicaciones. Inhibidores de la aldosterona sintasa adecuados para combinación en la presente invención preferidos incluyen, de manera enunciativa mas no limitativa, hidrocloreto de 3-(6-fluoro-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol-1-ilmetil)-benzonitrilo, 1-(4-metanosulfonil-benzil)-3-metil-2-piridin-3-il-1*H*-indol, éster

10 etílico de ácido 2-(5-benciloxi-piridin-3-il)-6-cloro-1-metil-1*H*-indol, 5-(3-cyano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-nicotínico, *N*-[5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-ethanesulfonamida, éster 5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-il de ácido pirrolidina-1-sulfónico, *N*-metil-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(2-pirrolidin-1-il-etilamino)-metil]-piridin-3-il}-1*H*-indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-2-[5-(4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-3-il]-1-metil-1*H*-

15 indol-3-carbonitrilo, 6-cloro-1-metil-2-{5-[(1-metil-piperidin-4-ilamino)-metil]-piridin-3-il}-1*H*-indol-3-carbonitrilo, [5-(6-cloro-3-ciano-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida de ácido morfolina-4-carboxílico, *N*-[5-(6-cloro-1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-ethanesulfonamida, *C,C,C*-trifluoro-*N*-[5-(1-metil-1*H*-indol-2-il)-piridin-3-ilmetil]-metanosulfonamida, *N*-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-4-trifluorometil-

20 bencenosulfonamida, *N*-[5-(3-Cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-1-fenil-metanosulfonamida, *N*-(5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)butano-1-sulfonamida, *N*-(1-(5-(4-ciano-3-methoxyfenil)piridin-3-il)etil)ethanesulfonamida, *N*-((5-(3-cloro-4-cianofenil)piridin-3-il)(ciclopropil)metil)ethanesulfonamida, *N*-(ciclopropil(5-(1*H*-indol-5-il)piridin-3-il)metil)ethanesulfonamida, *N*-(ciclopropil(5-naphtalen-1-il-piridin-3-il)metil)etanosulfonamida,

25 [5-(6-cloro-1-metil-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-piridin-3-ilmetil]-amida de ácido etanosulfónico y {[5-(3-cloro-4-ciano-fenil)-piridin-3-il]-ciclopropil-metil}-etil-amida de ácido etanosulfónico.

El término "antagonista del receptor de la endotelina" incluye bosentán y ambrisentán.

El término "inhibidor de CETP" se refiere a un compuesto que inhibe el transporte

30 mediado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterilo (CETP) de diversos ésteres de colesterilo y triglicéridos desde HDL a LDL y VLDL. Los expertos en la técnica podrán detectar fácilmente dicha actividad de inhibición de CETP usando ensayos convencionales (*por ejemplo*, Patente de Estados Unidos No. 6,140,343). Los ejemplos incluyen compuestos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 6,140,343 y la Patente

de Estados Unidos No. 6,197,786 (*por ejemplo*, éster etílico de ácido [2R,4S]4-[(3,5-bis-trifluorometil-bencil)-metoxycarbonil-amino]-2-etil-6-trifluorometil-3,4-dihidro-2H-quinolina-1-carboxílico (torcetrapib); compuestos divulgados en la Patente de Estados Unidos No. 6,723,752 (*por ejemplo*, (2R)-3-[[3-(4-cloro-3-etil-fenoxi)-fenil]-[[3-(1,1,2,2-tetrafluoro-etoxi)-fenil]-metil]-amino]-1,1,1-trifluoro-2-propanol); compuesto divulgados en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/807,838; derivados de polipéptidos divulgados en la Patente de Estados Unidos No. 5,512,548; derivados de rosenonolactona y análogos que contienen fosfato de éster de colesterilo divulgados en *J. Antibiot.*, 49(8): 815- 816 (1996), y *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 6: 1951-1954 (1996), respectivamente. Adicionalmente, los

5 inhibidores de CETP también incluyen aquellos divulgados en WO2000/017165, WO2005/095409, WO2005/097806, WO 2007/128568, WO2008/009435, WO 2009/059943 y WO2009/071509.

El término "inhibidor de NEP" se refiere a un compuesto que inhibe la endopeptidasa neutra (NEP) EC 3.4.24.11. Los ejemplos incluyen candoxatrilo, candoxatrilo, dexecadotril, ecadotril, racecadotril, sampatrilato, fasidotril, omapatrilato, gemopatrilato, daglutril, SCH-42495, SCH-32615, UK-447841, AVE-0848, PL-37 y éster etílico de ácido (2R, 4S)-5 bifenil-4-il-4-(3-carboxi-propionilamino)-2-metil-pentanóico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los inhibidores de NEP también derivados de dipéptidos fosfono/biarilo sustituidos, tal como se divulga en la Patente de los Estados Unidos No. 5,155,100. Los

15 inhibidores de NEP también incluyen derivado de N-mercaptoacil fenilalanina, tal como se divulga en la solicitud PCT No. WO 2003/104200.

Los inhibidores NEP también incluyen agentes antihipertensivos de doble efecto, tal como se divulga en las solicitudes PCT No. WO 2008/133896, WO 2009/035543 o WO 2009/134741. Otros ejemplos incluyen los compuestos divulgados en las solicitudes de patente de Estados

25 Unidos 12/788,794; 12/788,766 y 12/947,029. Los inhibidores NEP también incluyen compuestos divulgados en los documentos WO 2010/136474, WO 2010/136493, WO 2011/061271 y las solicitudes provisionales de Estados Unidos No. 61/414171 y 61/414163.

En una modalidad, la invención proporciona un método para la activación del receptor APJ, en un sujeto, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad

30 terapéuticamente eficaz de conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una modalidad, la invención proporciona un método de tratamiento de un trastorno o una enfermedad que responde a la activación del receptor APJ, en un sujeto, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado

de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En una modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que responde a la activación (agonismo) del receptor APJ, en un sujeto, donde la enfermedad o el trastorno se selecciona de entre insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, 10 retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

15 En una modalidad, la invención proporciona el uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso como un medicamento.

En una modalidad, la invención proporciona el uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o enfermedad que 20 responde a la activación del receptor APJ. En otra modalidad, la invención proporciona el uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que responde a la activación del receptor APJ, donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona específicamente de entre insuficiencia 25 cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, 30 lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

Ejemplificación de la invención:

Abreviatura	Definición
AA	Aminoácido
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
BSA	Albúmina de suero bovino
Boc	Terc-butiloxicarbonil
CAD	Detector de aerosol cargado
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA o DIEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa
EtOAc	Acetato de etilo
FA	Ácido graso
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBSS	Solución salina tamponada de Hank
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEP	Heptano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
LCMS	Cromatografía líquida - Espectroscopía de masas
LN	Logarithmus naturalis (logaritmo natural)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
Nle	Norleucina
NMR	Resonancia magnética nuclear
Oxima pura	2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
pE	Piroglutamato
PEG	Polietilenglicol
PG	Grupo protector
Pbf	Pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PBS	Tampón fosfato salino
Ph	Fenilo
PS	Poliestireno

POL	Soporte polimérico
Rt	Temperatura ambiente
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsilano
t _R	Tiempo de retención
Trt	Tritilo
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia
UV	Ultravioleta

Métodos

Método analítico A:

- 5
 - Acquity BEH 1,7{ut2 }m 2,1 x 50 mm
 - Eluyente: A: Agua (ácido fórmico al 0,1 %) ACN (ácido fórmico al 0,1 %)
 - Velocidad de flujo: 1 ml/min
 - Gradiente: 0 min B al 2 %; B al 2 % - 98 % en 1,76 min; 2,06 min B al 98 %; 2,16 min B al 2% B
- 10
 - Espectrómetro de masas: Cuadrupolo simple ESI rango de exploración 120-1600
 - HPLC: Waters Acquity
 - Temperatura: 50 C

Método analítico B:

- 15
 - Acquity BEH 1,7{ut2 }m 2,1 x 50 mm
 - Eluyente: A: Agua (ácido fórmico al 0,1 %) ACN (ácido fórmico al 0,1 %)
 - Velocidad de flujo: 1 ml/min
 - Gradiente: 0 min B al 40 %; B al 40 % - 80 % en 1,40 min; 2,05 min B al 98 %; 2,10 min B al 40 %;
- 20
 - Espectrómetro de masas: Cuadrupolo simple ESI rango de exploración 120-1600
 - HPLC: Waters Acquity
 - Temperatura: 50 C

Método analítico C:

- Hilic 2,1 x 100 mm
 - Eluyente: A: CO₂ B: MeOH
 - Velocidad de flujo: 2 ml/min
 - 5 • Gradiente: 0,15 min B al 2 %; B al 2 % - 50 % en 1,65 min; 2,1 min B al 50 %; 25 min B al 2 %; 2,25 min B al 2 %
 - Espectrómetro de masas: Cuadrapolo simple ESI
 - SCF: Waters Acquity
 - Temperatura: 55 C
- 10

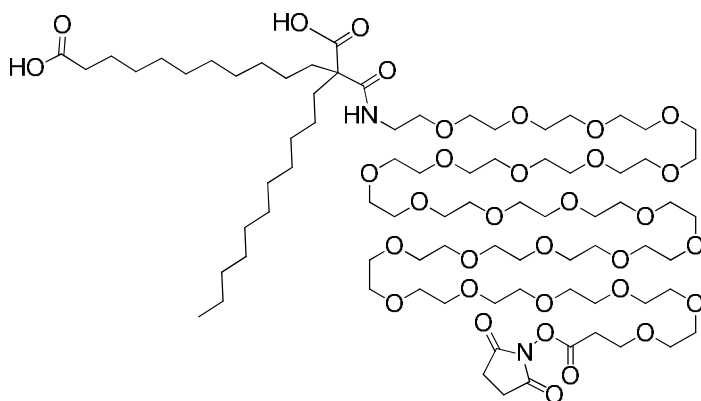
Método analítico D:

- Sunfire C18 3,5 µm 3,0 x 3,0 mm
- Eluyente: A: Agua (ácido trifluoroacético al 0,05 %); B: ACN
- Velocidad de flujo: 2 ml/min
- 15 • Gradiente: 0 min B al 5 %; B al 5 % - 80 % en 4,3 min; 4,70 min B al 95 %; 5,00 min B al 95 %; 5,10 min B al 5 %
- Espectrómetro de masas: Waters micromasa ZQ; Cuadrapolo simple ESI rango de exploración 120-1600
- HPLC: Agilent 1100 series
- 20 • Temperatura: 40 C

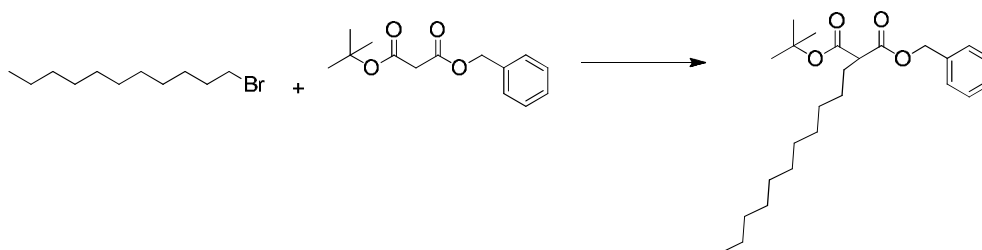
Método analítico E:

- Columna XBridge C18, 3,5 µm, 3,0 x 3,0 mm
- Eluyente: A: Agua + 5 mM hidróxido de amonio B: ACN
- 25 • Velocidad de flujo: 2 ml/min
- Gradiente: 0.0 min B al 2 %; B al 2 % - 95 % en 1,70 min; 2,00 min B al 95 %; 2,10 min B al 5 %;
- Espectrómetro de masas: Cuadrapolo simple ESI
- HPLC: Agilent 1100 series
- 30 • Temperatura: 40 C

Preparación del constructo de ácido graso-enlazador #1:



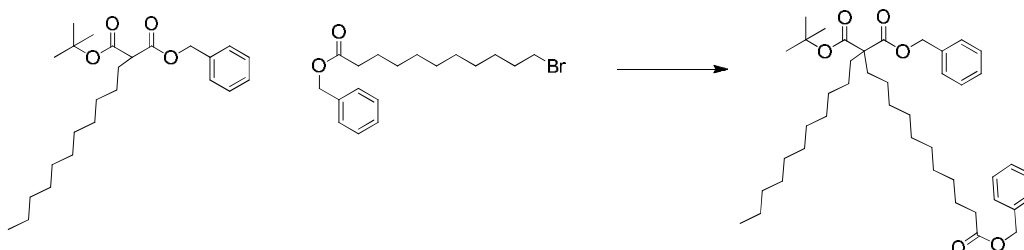
Paso 1: 1-bencil 3-terc-butil-2-undecilmalonato



5

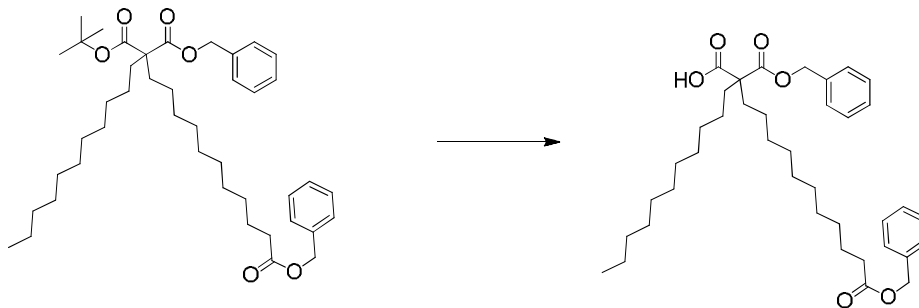
A una suspensión de NaH (160 mg; 4,0 mmol) en DMF (8 ml) a 0°C bajo N₂, se añadió malonato de terc-butil de bencilo (1,0 g; 4,0 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla se agitó durante 50 min y luego se añadió 1-bromoundecano en DMF (2 ml). Después de una hora adicional de agitación, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se mantuvo durante la noche. Se añadieron Et₂O (100ml) y agua (20ml) para particionar la reacción. La fase acuosa se extrajo con Et₂O (100 ml), y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna flash (C18 12g, 40-100 % ACN / agua + 0,1 % TFA) para producir el compuesto como un aceite incoloro (1,14 g; 2,82 mmol; 71 %): LCMS, Método B Rt = 1,58 min, M+Na 427,4; ¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0,84 - 0,96 (m, 3 H) 1,28 (br. s, 12 H) 1,31 (m, *J*=3,90 Hz, 6 H) 1,41 (s, 9 H) 1,88 (q, *J*=7,38 Hz, 2 H) 3,29 (t, *J*=7,58 Hz, 1 H) 5,19 (q, *J*=12,27 Hz, 2 H) 7,30 - 7,42 (m, 5 H).

Paso 2: 1,11-dibencil 11-terc-butil docosano-1,11,11-tricarboxilato



Una solución de 1-bencil 3-terc-butil 2-undecilmalonato (650mg; 1,61 mmol) en DMF (1mL) se añadió lentamente a una suspensión de NaH (70,7mg; 1,77 mmol) en DMF (6mL) a 0°C bajo N₂. La mezcla se agitó durante 40 min antes de añadir 11-bromoundecanoato de bencilo (571mg; 1,61 mmol) en DMF (1 ml). Después de la adición, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se diluyó con Et₂O (100ml) y se extrajo con agua (20 ml). La fase acuosa se extrajo con Et₂O (100 ml), y los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó. El residuo se purificó mediante columna ultrarrápida (80 g de sílice, EtOAc/HEP al 0-10 %) para producir el compuesto como un aceite incoloro (823 mg; 1,21 mmol; 75 %): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3 H) 1,12 (m, *J*=6,60 Hz, 4 H) 1,19 - 1,33 (m, 28 H) 1,35 (s, 9 H) 1,66 (quin, *J*=7,40 Hz, 2 H) 1,85 (t, *J*=8,44 Hz, 4 H) 2,37 (t, *J*=7,52 Hz, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,16 (s, 2 H) 7,30 - 7,42 (m, 10 H).

Paso 3: ácido 13-(benciloxi)-2-((benciloxi) carbonil)-13-oxo-2-undeciltridecanóico

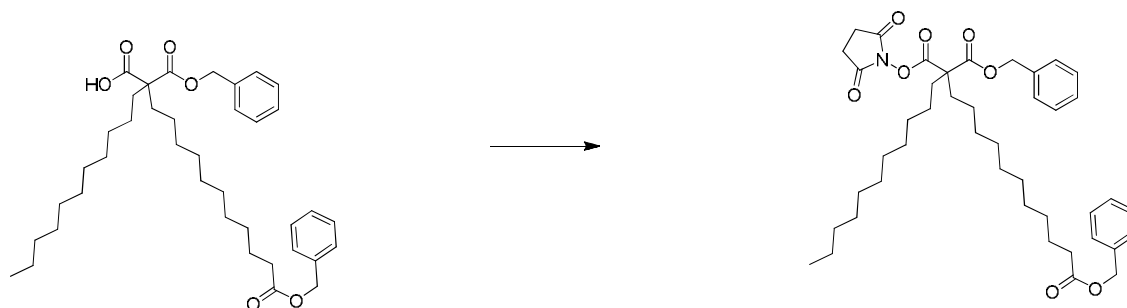


A una solución de un compuesto del paso 2 (200 mg; 0,295 mmol) en DCM (3 ml) se añadió TFA (0,6 ml), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna ultrarrápida (12 g de sílice, EtOAc/HEP al 0-15 %) para producir el compuesto (177 mg; 0,284 mmol; 96 %): ¹H NMR (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 0,87 - 0,94 (m, 3 H) 0,94 - 1,05 (m, 2 H) 1,19 (br. s., 14 H) 1,23 -

1,37 (m, 16 H) 1,65 (quin, $J=7,40$ Hz, 2 H) 1,78 - 1,91 (m, 2 H) 1,93 - 2,05 (m, 2 H) 2,37 (t, $J=7,52$ Hz, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,27 (s, 2 H) 7,31 - 7,44 (m, 10 H).

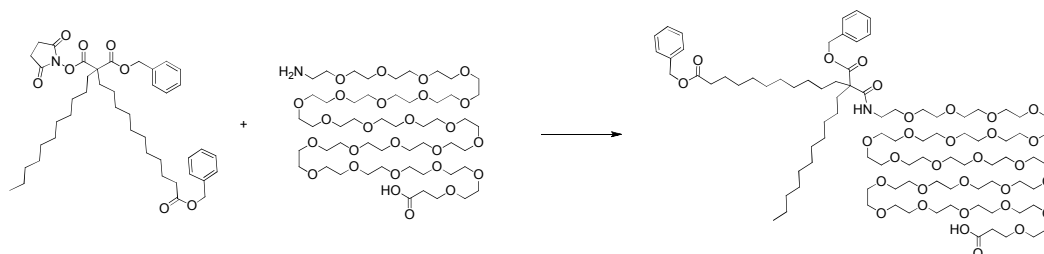
Paso 4: 1,11-dibencil 11-(2,5-dioxociclopentil) docosano-1,11,11-tricarboxilato

5



Una solución de DCC (58,6mg; 0,284mmol) en DCM (1 ml) se añadió a una solución del ácido del paso 3 (177 mg; 0,284 mmol) y N-hidroxisuccinimida (32,7mg; 0,284 mmol) en DCM (2 ml) y THF (0,3 ml) bajo N_2 . Luego, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna ultrarrápida (12 g de sílice, EtOAc/HEP al 0-35 %) para producir el compuesto como aceite incoloro (153 mg; 0,213 mmol; 75 %): ^1H NMR (400 MHz, CLOROFORMO- d) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3 H) 1,12 - 1,21 (m, 2 H) 1,21 - 1,37 (m, 30 H) 1,66 (quin, $J=7,40$ Hz, 2 H) 1,89 - 2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, $J=7,58$ Hz, 2 H) 2,84 (br. s., 4 H) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30 - 7,47 (m, 10 H).

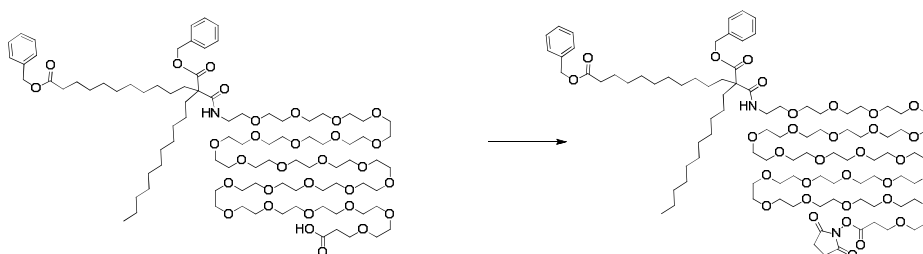
Paso 5:



Una solución del intermedio del paso 4 (145 mg; 0,201 mmol) en THF (1,5 ml) y DCM (1,5 ml) se añadió a un vial cargado con ácido amino-PEG24-carboxílico. Se añadió DIPEA (88 μ l; 0,504 mmol) y la reacción se agitó en un agitador de placas durante 15 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía de fluidos supercríticos (Waters HILIC 20 x 150 mm; MeOH/ CO_2 al 15-25 %) para producir el compuesto acoplado deseado

(151 mg; 0,086 mmol; 43 %): LCMS, Método C; Rt = 1,30 min, $[M+2H]^+ 2876,4$; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0,86 - 0,93 (m, 3 H) 0,93 - 1,04 (m, 2 H) 1,19 (br. s., 15 H) 1,23 - 1,37 (m, 15 H) 1,61 - 1,68 (m, 2 H) 1,78 (td, $J=12,44, 4,34$ Hz, 2 H) 1,92 - 2,05 (m, 2 H) 2,37 (t, $J=7,58$ Hz, 2 H) 2,62 (t, $J=6,05$ Hz, 2 H) 3,49 (dd, $J=6,72, 2,32$ Hz, 2 H) 3,52 - 3,59 (m, 2 H) 3,59 - 3,73 (m, 92 H) 3,80 (t, $J=6,05$ Hz, 2 H) 5,13 (s, 2 H) 5,18 (s, 2 H) 7,31 - 7,42 (m, 10 H) 8,09 (t, $J=5,26$ Hz, 1 H).

Paso 6:

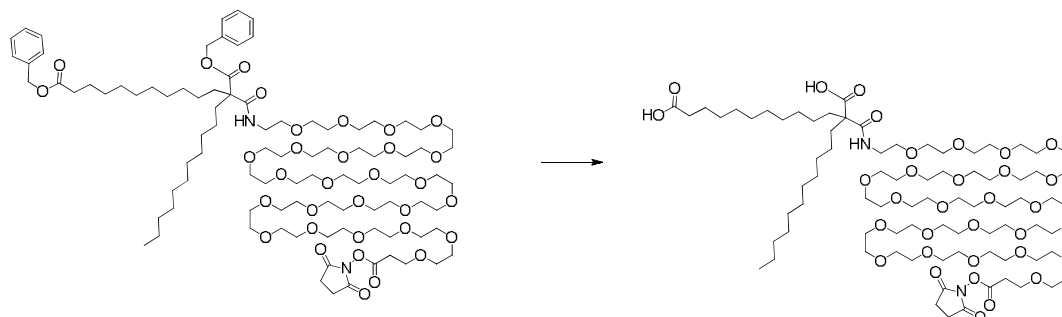


10

DCC (22 mg, 0,103 mmol) en DCM (0,265 mL) se añadió a una solución de compuesto del paso 5 (150 mg; 0,086 mmol) y N-hidroxisuccinimida en DCM (1,5 ml). La reacción se agitó durante 1,5 horas. Se añadió más N-hidroxisuccinimida (10 mg) en THF (0,5 ml) y DCC (22 mg) en DCM (0,265mL) y la reacción se agitó durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante columna ultrarrápida (12 g de sílice, MeOH/DCM al 0,5 %) para producir el compuesto NHS activado (159 mg, cuantitativo) como un sólido blanco: LCMS, Método B; Rt = 1,55 min, $[M+H_3O+H]^+ 933,9$.

15

Paso 7:

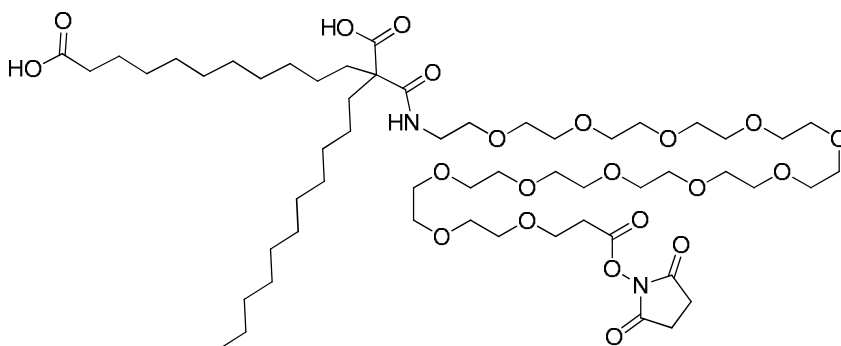


20

A una solución del compuesto del paso 6 (159 mg, 0,086 mmol) en THF (5 ml) se añadió una suspensión de Pd al 10% sobre carbono (4,6mg; 4,3 μ mol) en THF (1 ml). La reacción se

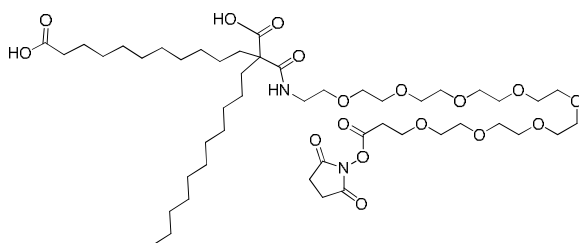
- colocó bajo hidrógeno y se agitó durante 40 minutos. Se añadió más Pd sobre carbono (7 mg; 6,5 μ mol) y luego se agitó 1 hora bajo hidrógeno. La reacción se pasó a través de un filtro de membrana y el filtrado se evaporó. El residuo se purificó mediante HPLC (C18 Sunfire 30 x 50mm, ACN al 45-70 % / agua + TFA al 0,1%) para producir el compuesto desprotegido (83 mg; 0,047 mmol; 54 %): LCMS, Método BRt = 1,03 min, [M+2H]²⁺ 835,2; ¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0,84 - 0,94 (m, 3 H) 1,17 (br, s, 2 H) 1,21 - 1,39 (m, 30 H) 1,57 - 1,68 (m, 2 H) 1,69 - 1,80 (m, 2 H) 1,97 - 2,10 (m, 2 H) 2,34 (t, *J*=7,21 Hz, 2 H) 2,86 (s, 4 H) 2,92 (t, *J*=6,48 Hz, 2 H) 3,51 - 3,73 (m, 96 H) 3,87 (t, *J*=6,48 Hz, 2 H) 7,45 (t, *J*=4,46 Hz, 1 H).
- 5
- 10 Los siguientes compuestos se prepararon de forma análoga al constructo de ácido graso-enlazador #1 reemplazando el ácido amino-PEG24-carboxílicos con el ácido amino-PEGN-carboxílico apropiado.

Preparación del constructo de ácido graso-enlazador #2:



- 15 El constructo de ácido graso-enlazador #2 se preparó usando ácido amino-PEG12-carboxílico y se aisló como un aceite incoloro;
- LC-MS: Método A: CAD: Ta 1,64 min; MS *m/z* 1138,0 [M-H]⁻;
- ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,36 (1H, br t), 3,76 (2H, t), 3,61-3,47 (46H, br m), 3,46-3,40 (2H, br m), 2,81 (2H, t), 2,74 (4H, br s), 2,24 (2H, t), 1,93 (2H, br t), 1,68-1,57 (2H, br m), 1,56-1,50 (2H, br m), 1,26-1,08 (34H, br m), 0,78 (3H, t).
- 20

Preparación del constructo de ácido graso-enlazador #3:



El constructo de ácido graso-enlazador #3 se preparó usando ácido amino-PEG8-carboxílico y se aisló como 2 fracciones, cada una de las cuales tenía impurezas ligeramente diferentes y cada uno de las cuales era un aceite incoloro.

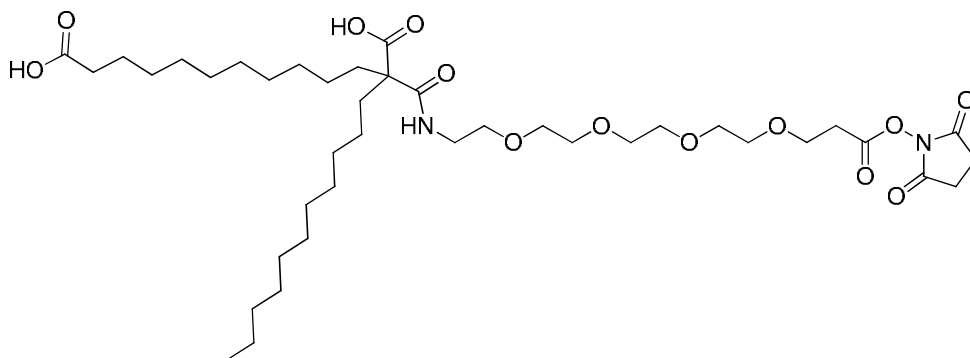
LC-MS: Método A CAD: Ta 1,65 min; MS m/z 963,8 [M-H]⁻;

1H NMR (400MHz, CDCl3): δ 7,27 (1H, br m), 3,70 (2H, t), 3,56-3,41 (30H, br m), 3,41-3,34 (2H, br m), 2,75 (2H, t), 2,69 (4H, br s), 2,19 (2H, t), 1,87 (2H, br t), 1,63-1,52 (2H, br m), 1,52-1,43 (2H, br m), 1,22-1,02 (32H, br m), 0,78 (3H, t).

LC-MS: Método B: CAD: Ta 1,65 min; MS m/z 963,8 [M-H]⁻;

1H NMR (400MHz, CDCl3): δ 7,48 (1H, m), 3,85 (2H, t), 3,71-3,56 (30H, br m), 3,56-3,49 (2H, br m), 2,90 (2H, t), 2,84 (4H, br s), 2,38-2,32 (2H, m), 2,02 (2H, br t), 1,78-1,58 (4H, br m), 1,38-1,16 (32H, m), 0,88 (3H, t).

Preparación del constructo de ácido graso-enlazador #4:



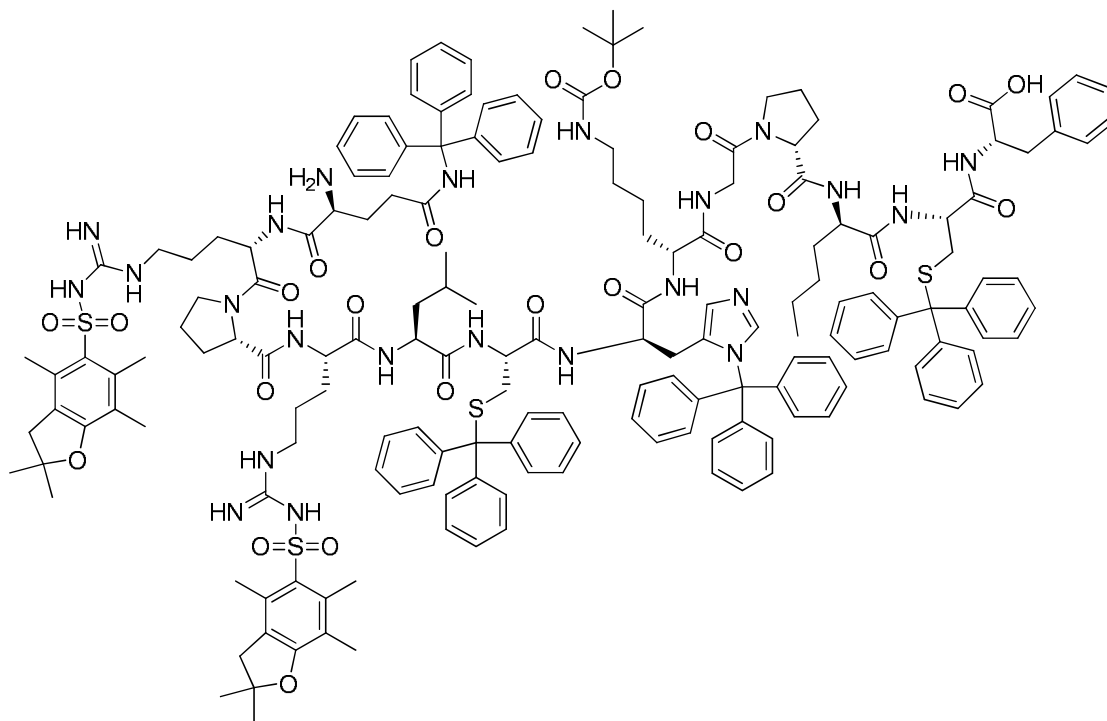
20 El constructo de ácido graso-enlazador se preparó usando ácido amino-PEG4-carboxílico y se aisló como un aceite de color amarillo pálido;

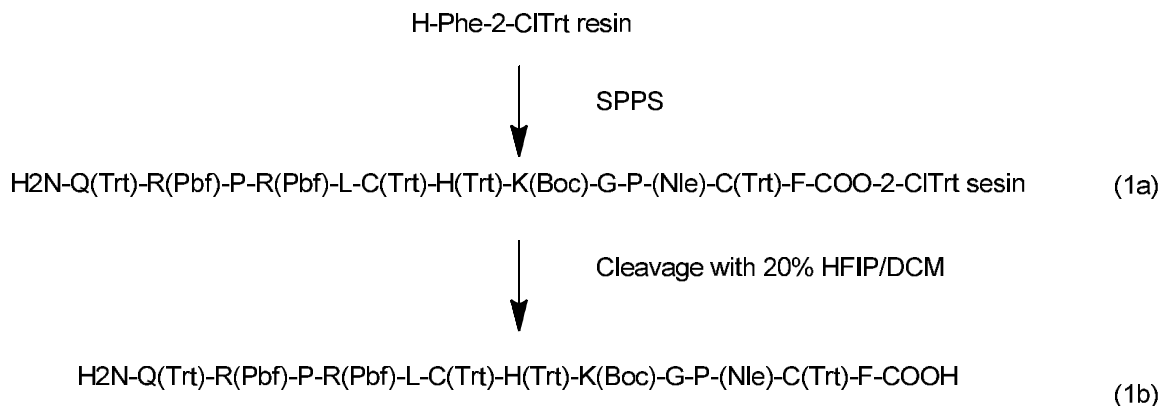
LC-MS: Método A: CAD: Ta 1,66 min; MS m/z 787,6 [M-H]⁻;

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7,24 (1H, br t), 3,85 (2H, t), 3,71-3,57 (14H, br m), 3,56-3,48 (2H, br m), 2,90 (2H, t), 2,84 (4H, br s), 2,35 (2H, t), 2,10-1,99 (2H, br m), 1,74-1,58 (4H, br m), 1,38-1,18 (32H, br m), 0,88 (3H, t).

5

Preparación de H₂N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COOH





Paso 1: Preparación del producto intermediario 1a

5 Tres lotes de resina H-Phe-2-CITrt (Novabiochem; 324 mg; 0,25 mmol; 0,73 mmol/g) se sometieron a síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático (LIBERTY BLUE) con Arg doble convencional para los residuos de Arg. Los aminoácidos se prepararon como soluciones de 0,2 M en DMF.

Un ciclo de acoplamiento se definió de la siguiente manera:

- Acoplamiento de aminoácidos: AA (4,0 eq.), HATU (4,0 eq.), DIEA (25 eq.)
- 10 • Lavado: DMF (3 x 7 ml, 1 min cada vez).
- Desprotección Fmoc: Piperidina/DMF (1:4) (7 ml, 75 °C durante 3 min).
- Lavado: DMF (3 x 7 ml, 1 min cada vez).

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x Tiempo de reacción	Reacción Temperatura
1	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	50 °C
2	Fmoc-L-Nle-OH	1 x 5 min	75 °C
3	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 °C
4	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 °C
5	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 min	75 °C
6	Fmoc-L-His(Trt)-OH	1 x 6 min	50 °C
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	50 °C
8	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min	75 °C
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 25 min	25 °C
10	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 °C
11	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 25 min	25 °C
12	Fmoc-L-His(Trt)-OH	1 x 5 min	75 °C

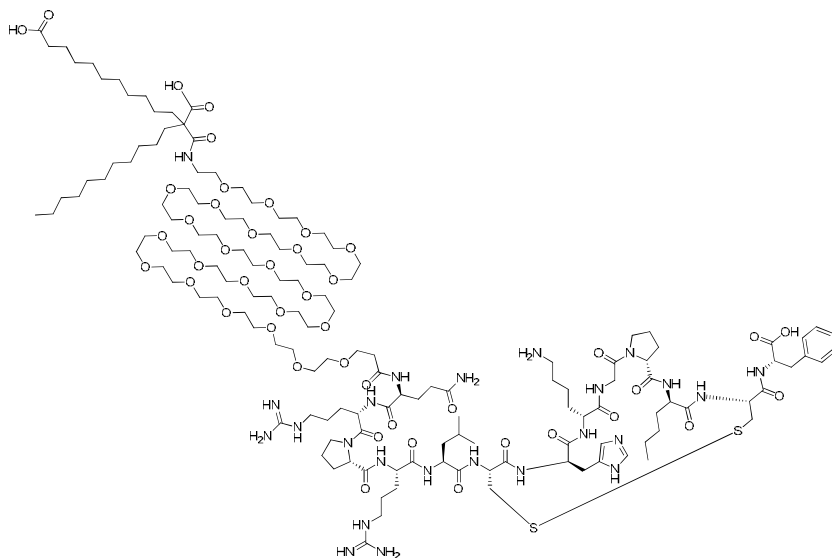
Después del ensamblaje del péptido, la resina se lavó con DMF (3 x 10 ml), DCM (3 x 10 ml). La resina peptídica se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar **producto intermediario 1a** (2,347 g; 0,75 mmol).

5 Paso 2: Preparación del **producto intermediario 1b**, **H₂N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COOH**

Al **intermedio 1a** (2,347 g; 0,75 mmol) se añadieron 24 mL de solución HFIP/DCM al 20 %. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min, luego se filtró; el filtrado se lavó con DCM (3 x 10 mL). El procedimiento anterior se llevó a cabo 4 veces con el fin de lograr la escisión completa. El filtrado combinado se concentró al vacío para proporcionar el **intermedio 1b** bruto (2,09 g, 68 %), el cual se llevó directamente a la siguiente etapa de reacción sin ser sometido a purificación. LC/MS Método E: Tiempo de retención: 1,74 minutos; MS M/2+1: observado: 1565,9; calculado: 1564,458.

15

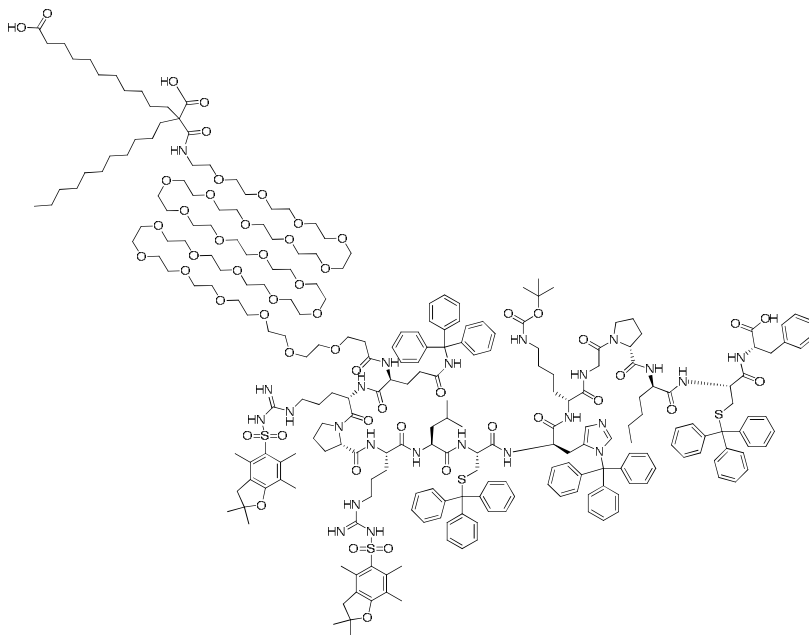
Ejemplo 1: Ácido graso-Enlazador#1- Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (C₆-C₁₂ puente disulfuro)



20 Paso 1:

A una solución de **intermedio 1b** (300 mg; 0,096 mmol) en THF (100 ml) se añadió constructo de ácido graso-enlazador # 1 (960 mg; 0,575 mmol) en THF (35 ml) y agua (15 ml). La mezcla

de reacción se agitó a temperatura ambiente. Al terminar, la reacción se concentró al vacío parcial y se llevó a la siguiente etapa de reacción como material en bruto, suponiendo un rendimiento cuantitativo. (PM del producto: 4681,870)



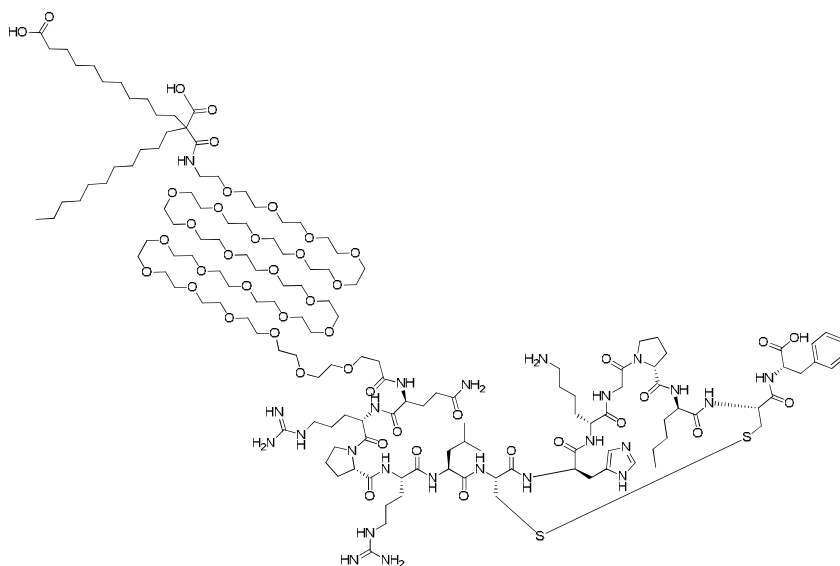
5 Paso 2: Desprotección:

A una solución de TFA (4,75 ml), TIPS (0,125 ml) y agua (0,125 ml) se añadió DTT (296 mg, 1,920 mmol). Luego se añadió el cóctel premezclado al compuesto del Paso 1: (449 mg, 0,096 mmol) y se agitó a temperatura ambiente. Al terminar, la reacción se concentró al vacío parcial.

- 10 El residuo se trató con éter dietílico enfriado, lo que produjo una mezcla de reacción turbia, la cual se dejó reposar a temperatura ambiente. La goma resultante se aisló mediante decantación del éter dietílico y se enjuagó con más éter dietílico enfriado. La goma se disolvió en agua (cantidad mínima) y se cargó en una columna C-18 de 55g para cromatografía de fase inversa. Usando un gradiente de disolvente entre 100% de agua (0,1% TFA) y 100% de
- 15 ACN durante un período de 20 minutos, la purificación proporcionó el compuesto desprotegido como un aceite de color amarillo pálido (160 mg, rendimiento de 54 %);

LC-MS: Método D: ELSD: Ta 2,62 min; MS m/z 1555,2 [(M/2)+H]⁺;

Paso 3: Formación de enlaces de disulfuro - ciclización

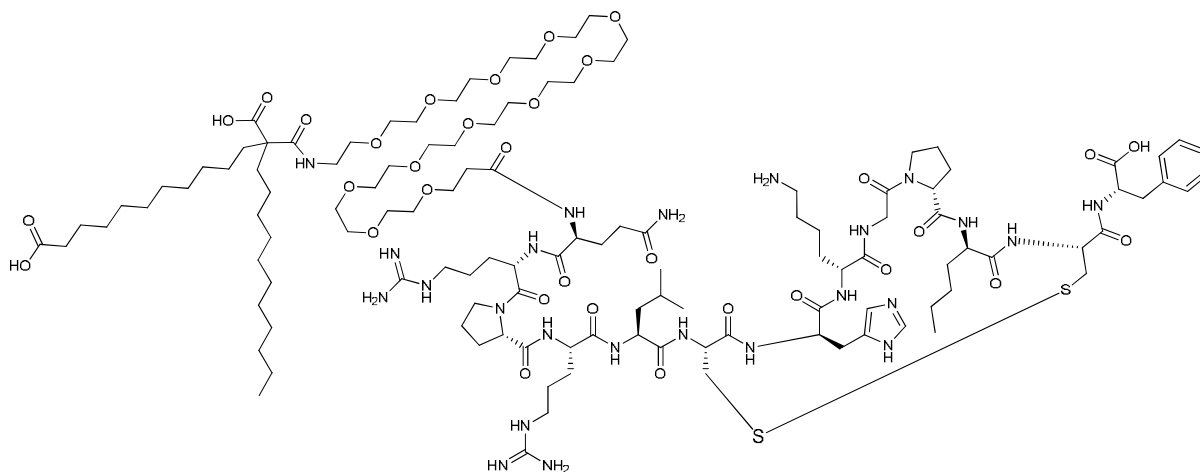


5 A una solución del compuesto desprotegido del Paso 2 (160 mg; 0,051 mmol) en agua (2 ml) se añadió yodo (50 mM en AcOH) (1,339 ml; 0,067 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Al finalizar, la mezcla de reacción se cargó directamente en una columna 55 g C18 (55ug) para cromatografía de fase inversa. El uso de un gradiente de disolvente entre 100% de agua (0,1% TFA) y 100% de ACN durante un período de 15 minutos, se combinaron las fracciones apropiadas mediante LCMS y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se liofilizó para proporcionar el compuesto (Ejemplo 1) como un sólido blanco;

LC-MS: Método D: ELSD: Ta 2,64 min; MS m/z 1554,3 [(M/2)+H]⁺;

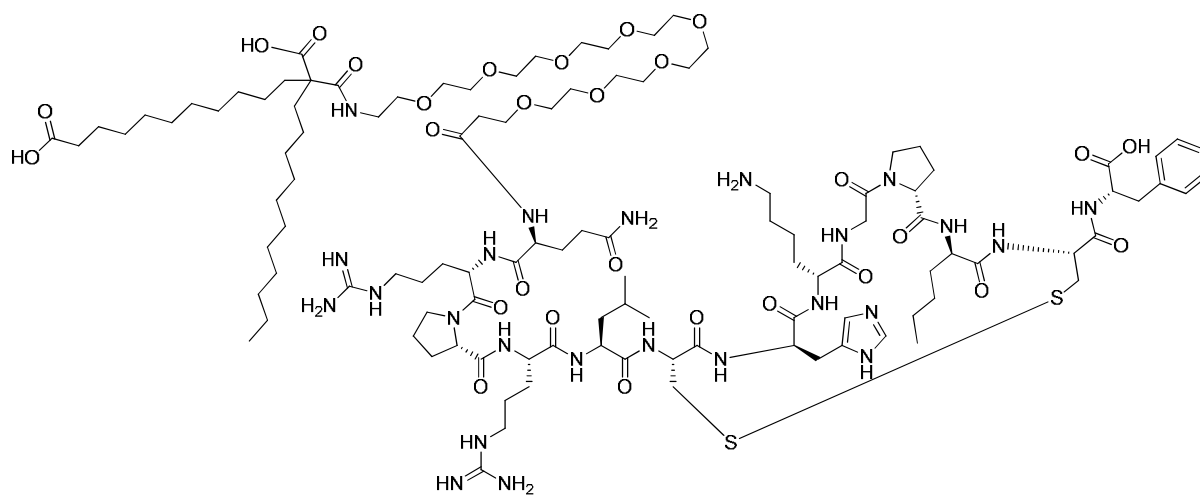
15 Los siguientes ejemplos se prepararon de manera similar al Ejemplo 1 sustituyendo el constructo de ácido graso-enlazador #1 con los constructos ácido graso-enlazador #2 a #4 apropiados.

Ejemplo 2: Conjugado con constructo de ácido graso-enlazador #2



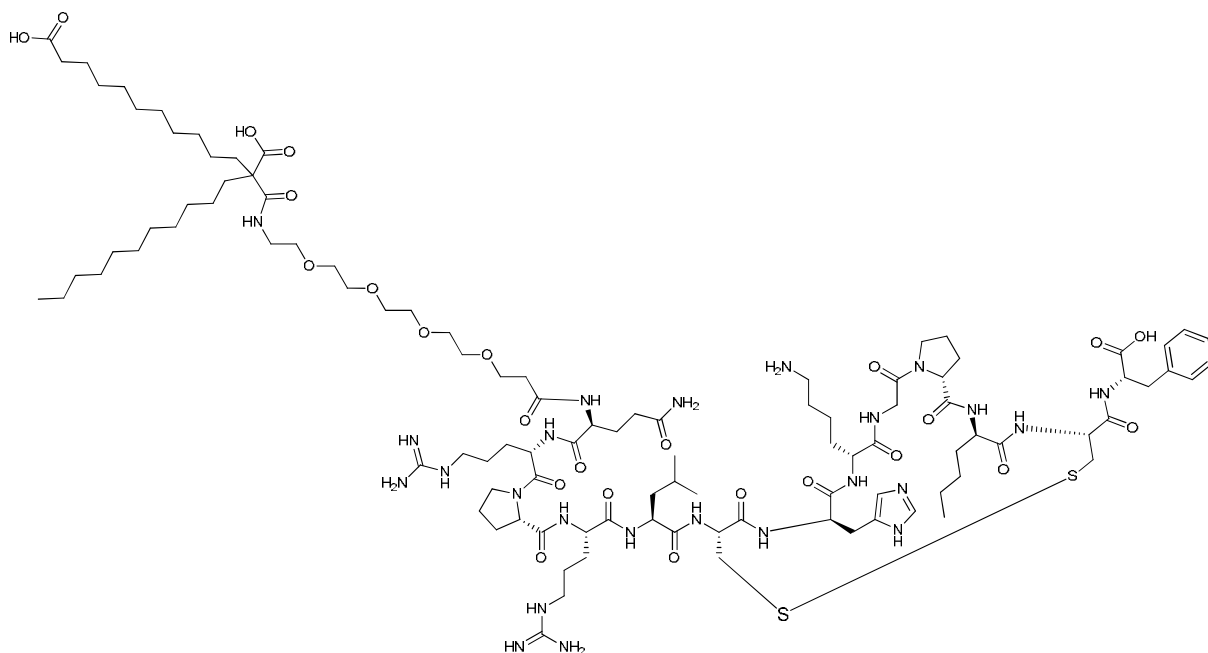
LC-MS: Método D: ELSD: Ta 2,56 min; MS m/z 1289,9 [(M/2)+H]⁺;

5 Ejemplo 3: Conjugado con constructo de ácido graso-enlazador #3



LC-MS: Método D: ELSD: Ta 2,52 min; MS m/z 1201,8 [(M/2)+H]⁺;

Ejemplo 4: Conjugado con constructo de ácido graso-enlazador #4



LC-MS: Método D: ELSD: Ta 2,49 min; MS m/z 1113,6 [(M/2)+H]⁺;

5 Se encontró que los conjugados en los ejemplos anteriores tienen valores EC₅₀ en un intervalo entre aproximadamente 0,01 nM y aproximadamente 1,100 nM para potencia del receptor APJ. Se encontró que los conjugados en los ejemplos anteriores tienen una estabilidad en plasma superior a 30 minutos, superior a 60 minutos, superior a 5 horas, superior a 10 horas, superior a 12 horas.

10

Se puede observar que los conjugados de la invención son útiles como agonistas del receptor APJ y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones que responden a la activación del receptor APJ, tales como las enfermedades descritas en el presente documento.

15

Así, habiendo descrito ejemplos de modalidades de la presente invención, los expertos en la técnica tendrán claro que las divulgaciones contenidas en ellos son con fines ilustrativos y que puede haber muchas otras alternativas, adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no está limitada a las modalidades específicas que se ilustran en la misma.

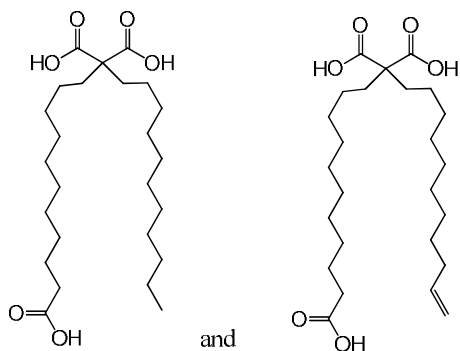
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende:

a. Un péptido agonista de APJ que tiene la siguiente fórmula (I):

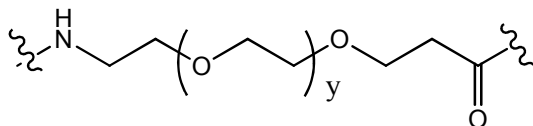
5 Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nie)-C*-F (I), o una amida o éster del mismo; en el que los dos aminoácidos de cisteína marcados con "*" forman un enlace disulfuro entre las funciones tiol de su cadena lateral; y

b. un ácido graso seleccionado de:



en el que dicho ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido a través de una de sus funciones de ácido carboxílico, opcionalmente a través de un enlazador polietilenglicol.

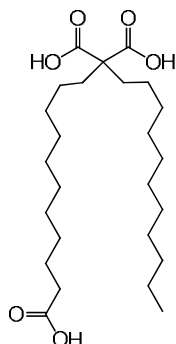
15 2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador de polietilenglicol (PEG) está presente y es de Fórmula (III):



20 (III) donde y es 1-30, donde la función carbonilo del enlazador de PEG forma un enlace amida con la funcionalidad amino en el extremo N-terminal del péptido de Fórmula (I) y donde la funcionalidad amino del enlazador de PEG forma un enlace amida con una de las funciones de ácido carboxílico del ácido graso.

3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el enlazador de polietilenglicol (PEG) es de Fórmula (III) e y es 2 a 25:

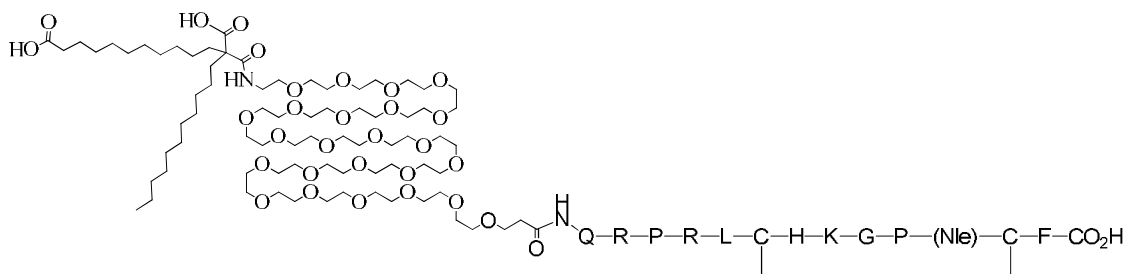
4. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el ácido
5 graso es

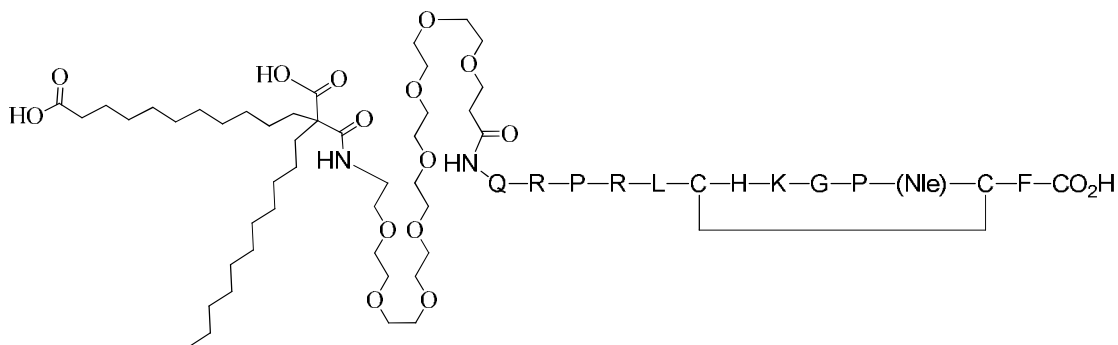


5. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido graso se conecta a la función amino del enlazador de PEG, o a la función amino del extremo
10 N-terminal del péptido si el enlazador de PEG no está presente, mediante una de sus funciones terminales de ácido carboxílico.

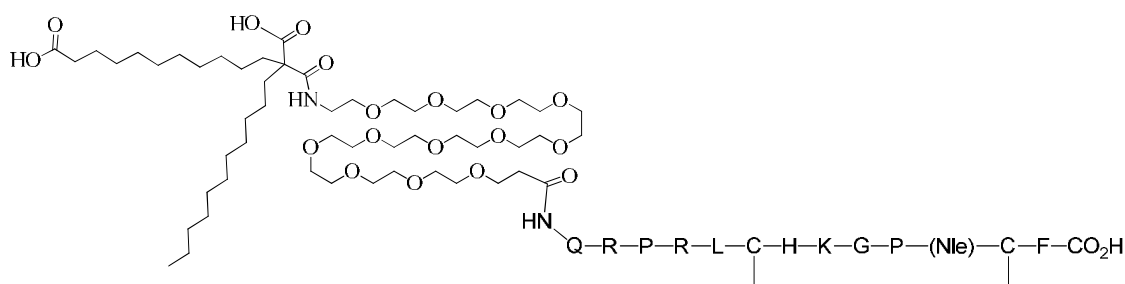
6. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido graso se conecta a la función amino del enlazador de PEG, o a la función amino del péptido si el
15 enlazador de PEG no está presente, mediante su función terminal de ácido carboxílico.

7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado de entre:

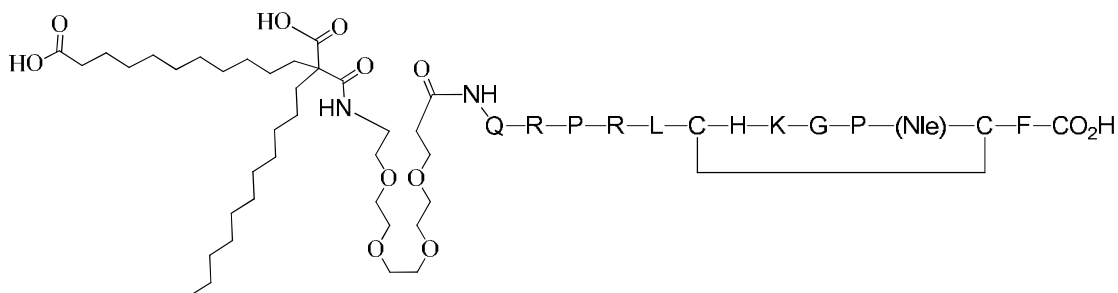




;



; y



5

; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un método para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno que responde al agonismo del receptor APJ, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona de entre insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica,

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

10. Un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso como un medicamento.

10

11. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno que responde al agonismo del receptor APJ.

12. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD), insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas, esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia.

13. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más co-agentes terapéuticamente activos.

14. Una combinación de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el co-agente se selecciona de entre inotropos, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de reductasa HMG-Co-A, antagonistas de receptores de angiotensina II, enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueadores de canales de calcio (BCC), antagonistas de endotelina, inhibidores de renina, diuréticos, miméticos de ApoA-I, agentes anti-diabéticos, agentes reductores de la obesidad, bloqueadores de receptores de aldosterona, bloqueadores de

30

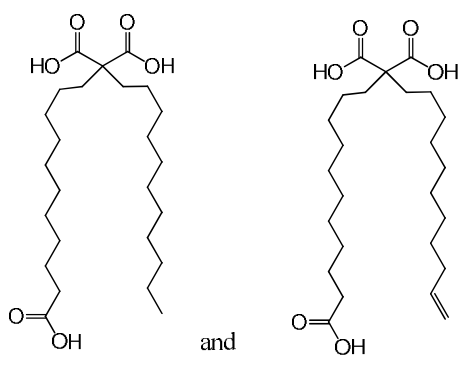
receptores de endotelina, inhibidores de aldosterona sintasa (ASI), un inhibidor de CETP, anti-coagulantes, relaxina, BNP (nesiritida) y un inhibidor de NEP.

15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Resumen

La invención proporciona un conjugado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende un polipéptido sintético de Fórmula I:

- 5 Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I) o una amida o éster del mismo; y un ácido graso seleccionado de:



- en el que dicho ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido a través de una de sus funcionalidades de ácido carboxílico, opcionalmente a través de un
- 10 enlazador de polietilenglicol; y en el que los dos aminoácidos de cisteína marcados con "*" forman un enlace disulfuro entre las funcionalidades tiol de su cadena lateral. Los conjugados son agonistas del receptor APJ. La invención también se refiere a un método para la fabricación de los conjugados de la invención y sus usos terapéuticos, tales como el tratamiento o la prevención de insuficiencia cardíaca aguda descompensada (ICAD),
- 15 insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión pulmonar, fibrilación atrial, síndrome de Brugada, taquicardia ventricular, aterosclerosis, hipertensión, restenosis, enfermedades isquémicas cardiovasculares, cardiomiopatía, fibrosis cardíaca, arritmias, retención de agua, diabetes (incluyendo diabetes gestacional), obesidad, enfermedad arterial periférica, accidentes cerebrovasculares, ataques isquémicos transitorios, lesiones cerebrales traumáticas,
- 20 esclerosis lateral amiotrófica, quemaduras (incluyendo quemaduras de sol) y preeclampsia. La presente invención proporciona además una combinación de agentes farmacológicamente activos y una composición farmacéutica.

Perfiles de exposición plasmática de los compuestos de los ejemplos 1 y 4 después de la administración subcutánea en ratones.

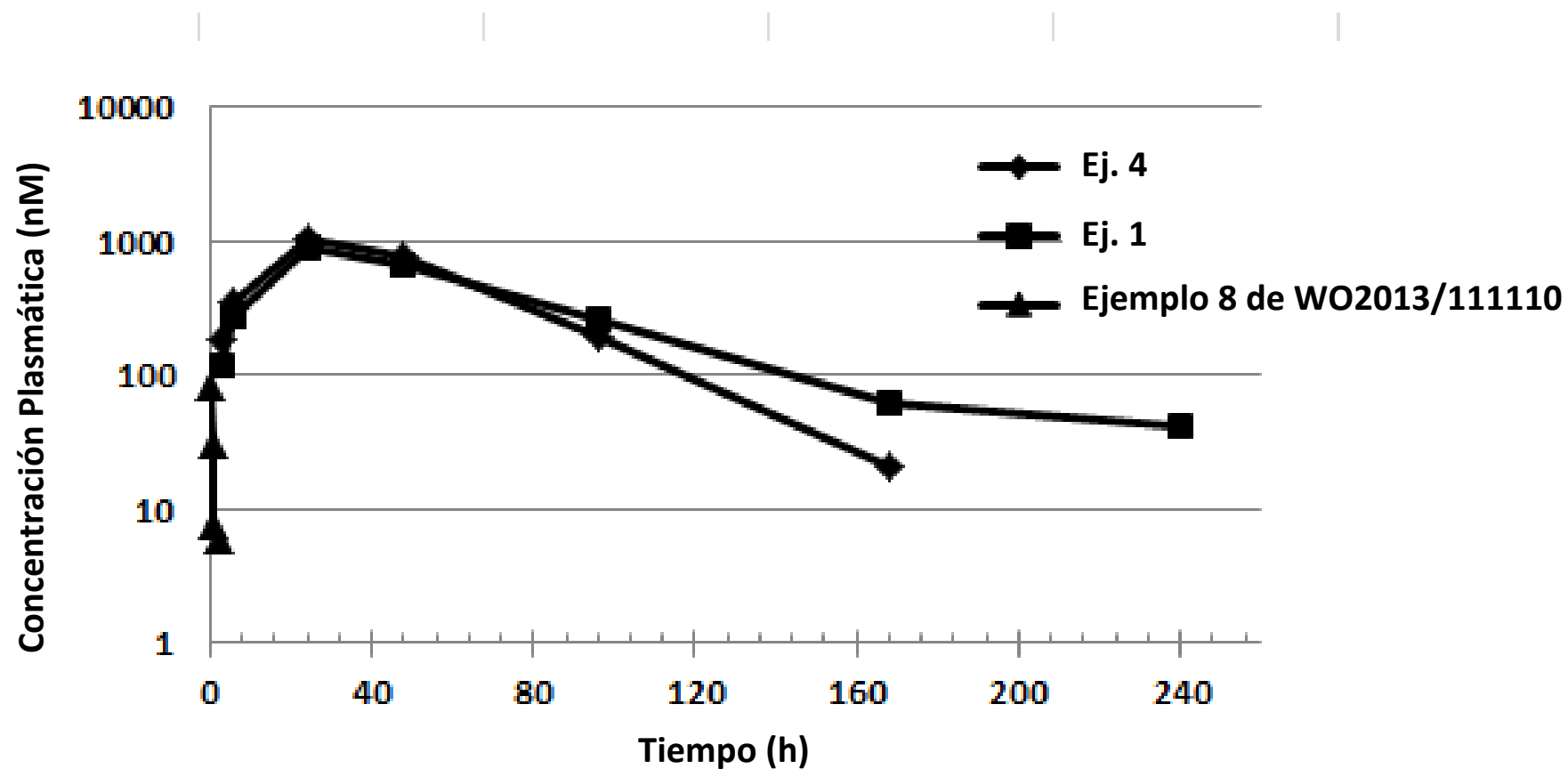


FIG. 1

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/SA/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.
PCT/B2016/050206

International filing date (day/month/year)
15.01.2016

Priority date (day/month/year)
23.01.2015

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48 A61K45/06 A61P9/04

Applicant
NOVARTIS AG

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 43bis.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 notified 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:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bliem, Barbara

Telephone No. +31 70 340-0



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 43bis.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 13ter.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 13ter.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-15</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Re Item V

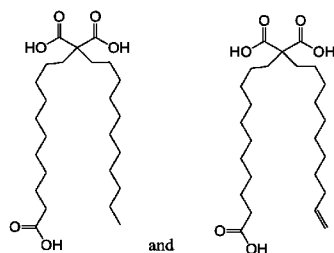
Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 For the assessment of the present claims 8 and 9 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment. The examination of the patentability of present claims 8 and 9 has been made assuming that claims 8 and 9 would be reformulated according to EPO practice when entering into the regional phase.
- 2 Patentability, in particular novelty and inventive step, of claims 10-12 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claims taking into account the alleged effects of the substance or composition.
- 3 Reference is made to the following document:

D1 WO 2013/111110 A2 (NOVARTIS AG [CH]) 1 August 2013
(2013-08-01)

D1 is regarded as being the prior art closest to the subject-matter of claims 1-15, and discloses a conjugate comprising an APJ agonist peptide having the formula Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH, wherein the two cysteine amino acids labeled with "*" form a disulfide bond between the thiol functionalities of their side chains and (ii) a fatty acid, in particular palmitoyl, lauroyl and myristoyl, wherein said fatty acid is covalently linked to the N-terminus of the peptide via a linker for the treatment of heart failure (examples 24,25,58-60; claims 17,27,29-36).

The subject-matter of claim 1 differs from D1 in that the fatty acid is selected from

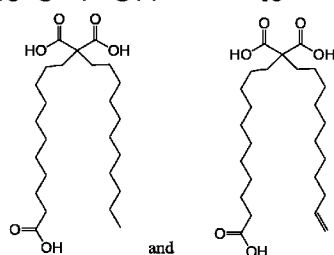


The subject-matter of claim 1 is therefore new (Article 33(2) PCT).

The problem to be solved by the present invention may be regarded as the provision of further conjugates of an APJ agonist peptide and a fatty acid for the treatment of heart failure.

As solution to said problem the application proposes the conjugates of claim 1. The conjugates of the present invention show improved plasma stability (compared to the unconjugated peptides) and APJ receptor potency (e.g. table 1).

There is no hint in the prior art that would prompt the skilled person facing the above-mentioned problem to link the APJ agonist peptide Q-R-P-R-L-C^{*}-H-K-G-P-Nle-C^{*}-F-OH to fatty acids selected from:



Therefore the subject-matter of claim 1 is not obvious over the prior art and involves an inventive step (Article 33(3) PCT).

Claims 2-15 are dependent on claim 1 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

Re Item VI

Certain documents cited

- 4 Reference is made to the following documents:
- D2 WO 2015/013169 A2 (NOVARTIS AG [CH]; CAPLAN SHARI L [US]; GOLOSOV ANDREI [US]; GROSCHE PH) 29 January 2015 (2015-01-29)
- D3 WO 2015/200078 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BARNES DAVID WENINGER [US]; YAMADA KEN [US]; IBEJUNJ) 30 December 2015 (2015-12-30)
- D4 WO 2015/013168 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BRUCE ALEXANDRA MARSHALL [US]; GROSCHE PHILIPP [CH];) 29 January 2015 (2015-01-29)

The examination has been carried out assuming that the priority of the application is valid. However, attention is drawn to the fact that D2-D4 which have been cited in the international search report as "P" documents and may become relevant for the question of inventive step of the present claims in the national/regional phase.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 56612-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2016/050206	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 January 2016 (15-01-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 23 January 2015 (23-01-2015)
Applicant NOVARTIS AG		

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

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ 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:

- ☒ 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. ☐ 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**,

- ☒ 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**,

- ☒ 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

- ☒ 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/IB2016/050206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48 A61K45/06 A61P9/04
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/111110 A2 (NOVARTIS AG [CH]) 1 August 2013 (2013-08-01) cited in the application claims 17,27,29-36; examples 24,25,58-60 -----	1-15
X,P	WO 2015/013169 A2 (NOVARTIS AG [CH]; CAPLAN SHARI L [US]; GOLOSOV ANDREI [US]; GROSCHKE PH) 29 January 2015 (2015-01-29) claims 1,20,26,30,31,33-39 example 20 page 32, paragraph 1 -----	1-15
X,P	WO 2015/200078 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BARNES DAVID WENINGER [US]; YAMADA KEN [US]; IBEJUNJ) 30 December 2015 (2015-12-30) examples 20,21 ----- -/-	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 April 2016

Date of mailing of the international search report

12/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bliem, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2016/050206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2015/013168 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BRUCE ALEXANDRA MARSHALL [US]; GROSCHE PHILIPP [CH];) 29 January 2015 (2015-01-29) claims 28,29,31-35; examples 40,41 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/050206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013111110	A2	01-08-2013	AR 089808 A1 17-09-2014
		AU 2013213265 A1 18-09-2014	
		CA 2862240 A1 01-08-2013	
		CL 2014001994 A1 03-11-2014	
		CN 104220452 A 17-12-2014	
		CO 7020879 A2 11-08-2014	
		CR 20140364 A 17-11-2014	
		EA 201491433 A1 30-12-2014	
		EP 2807183 A2 03-12-2014	
		HK 1200470 A1 07-08-2015	
		JP 2015506370 A 02-03-2015	
		KR 20140117603 A 07-10-2014	
		NZ 627772 A 27-11-2015	
		PE 21942014 A1 21-12-2014	
		PH 12014501701 A1 13-10-2014	
		SG 11201404369P A 28-08-2014	
		TW 201335190 A 01-09-2013	
		US 2013196899 A1 01-08-2013	
		US 2014142022 A1 22-05-2014	
		US 2015252076 A1 10-09-2015	
		UY 34593 A 02-09-2013	
		WO 2013111110 A2 01-08-2013	
WO 2015013169	A2	29-01-2015	AU 2014293387 A1 11-02-2016
			CA 2918077 A1 29-01-2015
			SG 11201600208R A 26-02-2016
			TW 201518323 A 16-05-2015
			US 2015030594 A1 29-01-2015
			UY 35671 A 27-02-2015
			WO 2015013169 A2 29-01-2015
WO 2015200078	A1	30-12-2015	US 2016030585 A1 04-02-2016
			UY 36186 A 29-01-2016
			WO 2015200078 A1 30-12-2015
WO 2015013168	A1	29-01-2015	AU 2014293386 A1 11-02-2016
			CA 2918074 A1 29-01-2015
			SG 11201600211X A 26-02-2016
			TW 201536814 A 01-10-2015
			US 2015031604 A1 29-01-2015
			UY 35670 A 27-02-2015
			WO 2015013168 A1 29-01-2015