

ANÁLOGOS DE RELAXINA Y MÉTODOS PARA USARLOS

[0001] La divulgación se refiere en general a biología y medicina, y se refiere más particularmente a análogos de relaxina (RLN), en especial análogos de RLN monocatenarios de acción prolongada que pueden fijarse a un receptor de péptido de la familia similar a RLN/insulina (RXFP), tal como el receptor RXFP1, para funcionar así como agonistas del receptor RXFP. La divulgación se refiere además a composiciones que incluyen estos y a su uso en el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares, pulmonares y/o renales.

[0002] Las relaxinas (RLN) son parte de la superfamilia de insulina y, en seres humanos, incluyen siete péptidos de alta similitud estructural pero baja similitud de secuencia: RLN1 (H1RLX, RLXH1 o H1), RLN2 (H2RLX, RLXH2 o H2), RLN3 (RXN3, ZINS4 o H3), péptido similar a la insulina (INSL) 3 (INSL3), INSL4, INSL5 e INSL6. De particular interés en la presente es RLN2, que es un heterodímero de dos cadenas peptídicas de veinticuatro y veintinueve aminoácidos (cadena A y cadena B), respectivamente, ligadas por dos puentes disulfuro, en donde la cadena A tiene además un puente disulfuro intramolecular (ver Schwabe y McDonald (1977) *Science* 197:914-915). RLN2 se produce a partir de su prohormona, la prorelaxina, al escindir un péptido C a partir de esta.

[0003] Fisiológicamente, RLN2 exhibe una amplia gama de funciones que modulan las adaptaciones cardiovasculares, hepáticas, neurales, pancreáticas, pulmonares y renales, tales como los efectos vasodilatadores, antifibróticos y angiogénicos, a pesar de que se describió inicialmente como una hormona del embarazo. La señalización de RLN2 se produce a través de dos clases diferentes de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), a saber, GPCR que contienen repeticiones ricas en leucina LGR7 y LGR8, ahora denominados receptores RXFP1 y RXFP2, respectivamente. Otros dos receptores en esta familia incluyen los receptores RXFP3 y RXFP4. RLN2 tiene una semivida corta ($t_{1/2}$), lo que presenta desafíos cuando se usa como agente terapéutico. De hecho, el RLN2 nativo tiene una $t_{1/2}$ de minutos *in vivo*. Por consiguiente, los médicos administran RLN2 mediante infusión intravenosa continua, lo que a menudo genera molestias para los individuos que reciben el compuesto de RLN e inconvenientes para la eficacia a corto plazo.

[0004] Existen varios análogos de RLN2 que tienen una $t_{1/2}$ mejorada. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2018/148419 describe

análogos que incluyen un residuo de aminoácido no nativo, tal como para-acetil-fenilalanina, a los que se pueden unir ligadores, polímeros y/o potenciadores farmacocinéticos para mejorar la $t_{1/2}$. La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2018/138170 describe análogos que son fusiones de la cadena A y la cadena B que tienen un ligador de al menos quince aminoácidos y una porción que prolonga la semivida para mejorar la $t_{1/2}$. La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2017/201340 describe análogos que son fusiones de la cadena A y la cadena B que tienen un fragmento de cadena liviana variable para mejorar la $t_{1/2}$. La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/067791 describe análogos que son profármacos ligados a portadores, especialmente portadores a base de PEG, para mejorar la $t_{1/2}$ (ver también, WO 2012/024452 para obtener análogos ligados a PEG adicionales). La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2014/102179 describe análogos que son fusiones de la cadena A y la cadena B que tienen una porción Fc de IgG2 o IgG4 para mejorar la $t_{1/2}$. La publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2013/004607 describe análogos que son fusiones de la cadena A y la cadena B que tienen un ligador de al menos cinco aminoácidos pero menos de quince aminoácidos para mejorar la $t_{1/2}$ o que son fusiones de la cadena A y la cadena B que tienen un dominio Fc de anticuerpos para mejorar la $t_{1/2}$.

[0005] En vista de la creciente comprensión de los diversos roles fisiológicos de RLN, sigue existiendo la necesidad de análogos de RLN de acción prolongada que tengan una $t_{1/2}$ mejorada.

[0006] Para abordar esta necesidad, la divulgación primero describe análogos de RLN monocatenarios que tienen actividad principal en el receptor RXFP1 (es decir, actúan como agonistas del receptor RXFP1). Tales agonistas del receptor RXFP1 incluyen una estructura básica desde un terminal amino (terminal N) hasta un terminal carboxi (terminal C) de:

VHH-L₁-A-L₂-B,
VHH-L₁-B-L₂-A,
A-L₂-B-L₁-VHH, o
B-L₂-A-L₁-VHH,

donde VHH es una porción que puede actuar como un potenciador farmacocinético, A es una cadena A de RLN, B es una cadena B de RLN, L₁ es un primer ligador y L₂ es un segundo ligador.

[0007] En algunos casos, la porción VHH puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, 11, 12 o 13, especialmente SEQ ID NO:10 o 12. En otros casos, la

porción VHH puede tener una o más adiciones, eliminaciones, inserciones o sustituciones de modo tal que la porción VHH tiene una secuencia de aminoácidos con al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:10, 11, 12 o 13 (ver, por ejemplo, SEQ ID NO:45-66).

[0008] En algunos casos, la cadena A puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, 5 u 8, especialmente SEQ ID NO:5. En otros casos, la cadena A puede tener una o más adiciones, eliminaciones, inserciones o sustituciones de modo tal que la cadena A tiene una secuencia de aminoácidos con al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:2, 5 u 8. Por ejemplo, la cadena A puede ser des1-4 de SEQ ID NO:5.

[0009] En algunos casos, la cadena B puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, 6 o 9, especialmente SEQ ID NO:6. En otros casos, la cadena B puede tener una o más adiciones, eliminaciones, inserciones o sustituciones de modo tal que la cadena B tiene una secuencia de aminoácidos con al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:3, 6 o 9. Por ejemplo, la cadena B puede ser des1 de SEQ ID NO:6.

[0010] En algunos casos, L_1 puede tener una secuencia de aminoácidos de $(GGGGQ)_n$ (SEQ ID NO:14), $(GGGQ)_n$ (SEQ ID NO:15), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:16), $(PGPQ)_n$ (SEQ ID NO:17) o $(PGPA)_n$ (SEQ ID NO:18), donde n puede ser de 1 a 10, especialmente de alrededor de 5 a alrededor de 8. En otros casos, L_1 puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, 20 o 21. En aun otros casos, L_1 puede tener una o más adiciones, eliminaciones, inserciones o sustituciones de modo tal que L_1 tiene una secuencia de aminoácidos con al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:14 a 21.

[0011] En algunos casos, L_2 puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22, 23 o 67. En otros casos, L_2 puede tener una o más adiciones, eliminaciones, inserciones o sustituciones.

[0012] En ciertos casos, los análogos de RLN pueden tener una secuencia de aminoácidos que incluye una VHH de SEQ ID NO:10, 11, 12 o 13; una cadena A de SEQ ID NO:2, 5 u 8; una cadena B de SEQ ID NO:3, 6 o 9; un L_1 de SEQ ID NO:19, 20 o 21; y un L_2 de SEQ ID NO:22, 23 o 67. Alternativamente, los análogos de RLN pueden tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de aminoácidos que incluye un VHH de SEQ ID NO:10, 11, 12 o 13; una cadena A de SEQ ID NO:2, 5 u 8; una cadena B de SEQ ID NO:3, 6 o 9; un L_1

de SEQ ID NO:19, 20 o 21; y un L₂ de SEQ ID NO:22, 23 o 67.

[0013] En casos particulares, los análogos de RLN pueden tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39, especialmente SEQ ID NO:26, 27, 30, 31, 34 o 35. Alternativamente, los análogos de RLN pueden tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos de alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39, especialmente SEQ ID NO:26, 27, 30, 31, 34 o 35.

[0014] En algunos casos, los análogos de RLN tienen una afinidad de fijación en un receptor RXFP1 que es comparable con la afinidad de fijación de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6). En otros casos, los análogos de RLN tienen una afinidad de fijación en un receptor RXFP1 que es mayor que la de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6). En aun otros casos, los análogos de RLN tienen una afinidad de fijación en un receptor RXFP1 que es menor que la de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6).

[0015] En algunos casos, los análogos de RLN tienen una t_{1/2} que es más larga que la del RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6), incluso hasta de alrededor de 20 días a alrededor de 30 días más larga cuando se administra a un ser humano.

[0016] Alternativamente, las composiciones anteriores pueden ser secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la presente, así como vectores y células huésped que incluyen estas para expresar los análogos de RLN de la presente.

[0017] En segundo lugar, se describen composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un análogo de RLN de la presente o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este (por ejemplo, sales de trifluoroacetato, sales de acetato o sales de clorhidrato) y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunos casos, el portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico es un amortiguador tal como, por ejemplo, solución salina fisiológica, solución salina amortiguada con fosfato, solución salina amortiguada con citrato o solución salina amortiguada con histidina. En ciertos casos, el amortiguador es histidina, un amortiguador de histidina o una solución salina amortiguada con histidina. En otros casos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir además portadores, diluyentes y/o excipientes.

[0018] Además, las composiciones farmacéuticas pueden incluir al menos un agente terapéutico adicional tal como, por ejemplo, un agente utilizado como un tratamiento de referencia en una afección, enfermedad o trastorno cardiovascular, pulmonar y/o renal. En algunos casos, el al menos un agente terapéutico adicional puede ser un

anticoagulante, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB), un inhibidor de neprilisina ARB (ARNI), un bloqueador β , un diurético, digitalis, digoxina, dinitrato de hidralazina/isorbida, un antagonista del receptor de mineralocorticoides (MRA; o antagonista de aldosterona), un inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2), una estatina y/o un agente antiglicémico.

[0019] En tercer lugar, se describen métodos para usar los análogos de RLN de la presente, especialmente para usar los análogos de RLN para tratar afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares, pulmonares y/o renales. Los métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de al menos un análogo de RLN de la presente o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

[0020] En algunos casos, el análogo de RLN puede administrarse por cualquier vía de administración estándar, tal como, por ejemplo, intramuscular, intravenosa, parenteral, subcutánea o transdérmica. En ciertos casos, el análogo de RLN se administra por vía subcutánea (SQ), intramuscular (IM) o intravenosa (IV). En casos particulares, el análogo de RLN puede administrarse por vía SQ o IV al individuo.

[0021] Del mismo modo, y en algunos casos, el análogo de RLN puede administrarse diariamente, día por medio, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana (es decir, semanalmente), quincenalmente (es decir, semana por medio), una vez al mes (es decir, mensualmente), cada dos meses (es decir, mes por medio) o incluso cada tres meses. En ciertos casos, el análogo de RLN puede administrarse por vía SQ día por medio, SQ tres veces a la semana, SQ dos veces a la semana, SQ una vez a la semana, SQ semana por medio o SQ una vez al mes. En casos particulares, el análogo de RLN se administra por vía SQ una vez a la semana (QW).

[0022] Alternativamente, el análogo de RLN puede administrarse por vía IV al individuo. Como se mencionó anteriormente, el análogo de RLN puede administrarse diariamente, día por medio, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana (es decir, semanalmente), quincenalmente (es decir, semana por medio) o mensualmente. En ciertos casos, el análogo de RLN puede administrarse por vía IV día por medio, IV tres veces a la semana, IV dos veces a la semana, IV una vez a la semana, IV semana por medio o IV una vez al mes. En casos particulares, el análogo de RLN se administra por vía IV una vez a la semana.

[0023] Los métodos también pueden incluir una etapa de administración del análogo de RLN en combinación con una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico

adicional. Sucintamente, el tratamiento de referencia para muchas de las afecciones/enfermedades/trastornos en la presente incluye un anticoagulante, un inhibidor de ACE, un ARB, un ARNI, un β bloqueador, un diurético, digitalis, digoxina, dinitrato de hidralazina/isorbida, un MRA u otro antagonista de aldosterona, un inhibidor de SGLT2, una estatina y/o un agente antiglicémico, así como otros agentes terapéuticos para controlar las comorbilidades que incluyen, entre otros, colesterol alto, presión arterial alta, fibrilación auricular y diabetes. En algunos casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse de manera simultánea, separada o secuencial con el análogo de RLN.

[0024] Por ejemplo, el agente terapéutico adicional puede administrarse con una frecuencia igual a la del análogo de RLN (es decir, día por medio, dos veces a la semana, semanalmente o incluso mensualmente). En otros casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse con una frecuencia distinta a la del análogo de RLN. En otros casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse por vía SQ o IV. En aun otros casos, el análogo de RLN se administra por vía SQ, y el agente terapéutico adicional puede administrarse por vía oral o IV. Alternativamente, el análogo de RLN se administra por vía IV, y el agente terapéutico adicional se administra por vía SQ.

[0025] En algunos casos, el individuo que lo necesita es un diabético, hipertenso con insuficiencia renal y/u obeso.

[0026] Los métodos también pueden incluir etapas tales como medir u obtener la presión arterial y comparar estos valores obtenidos con uno o más valores de referencia o valores obtenidos previamente para evaluar la eficacia del tratamiento.

[0027] Los métodos también pueden combinarse con dieta y ejercicio y/o pueden combinarse con agentes terapéuticos adicionales distintos de los analizados anteriormente.

[0028] En cuarto lugar, se describen usos que incluyen al menos uno de los análogos de RLN de la presente. Por ejemplo, los análogos de RLN de la presente pueden proporcionarse para su uso en tratamiento, especialmente en el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares, pulmonares y/o renales. Opcionalmente, los análogos de RLN pueden administrarse de manera simultánea, separada o secuencial (es decir, en combinación) con al menos un agente terapéutico adicional. Del mismo modo, el uso de los análogos de RLN de la presente se proporciona en la elaboración de un medicamento para tratar afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares, pulmonares y/o renales, donde el medicamento puede incluir además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales como se indicó

anteriormente.

[0029] En quinto lugar, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:10.

[0030] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una
secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:11). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:11.

[0031] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una
secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:12.

[0032] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una
secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:13). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:13.

[0033] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una
secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRVTSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %

de similitud de secuencia con SEQ ID NO:45.

[0034] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:46.

[0035] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:47). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:47.

[0036] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:48). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:48.

[0037] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
ETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYP
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %
de similitud de secuencia con SEQ ID NO:49.

[0038] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
QTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYP
YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:50). En algunos casos, el compuesto puede tener una
secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %

de similitud de secuencia con SEQ ID NO:50.

[0039] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:51). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:51.

[0040] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:52.

[0041] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:53). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:53.

[0042] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:54). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:54.

[0043] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:55). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %

de similitud de secuencia con SEQ ID NO:55.

[0044] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:56). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:56.

[0045] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:57). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:57.

[0046] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:58). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:58.

[0047] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:59). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:59.

[0048] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRQLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %

de similitud de secuencia con SEQ ID NO:60.

[0049] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:61). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:61.

[0050] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:62.

[0051] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:63). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:63.

[0052] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:64). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:64.

[0053] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:65). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 %

de similitud de secuencia con SEQ ID NO:65.

[0054] De manera alternativa, se proporciona un compuesto que incluye una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66). En algunos casos, el compuesto puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 90 % a alrededor de 99 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO:66.

[0055] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que pueden sintetizarse de manera química o recombinante como un polipéptido monocatenario (es decir, monomérico) y, por lo tanto, no requieren procesamiento endoproteolítico para la actividad biológica. Sin embargo, se contempla que, en algunos casos, la porción VHH puede conjugarse no solo con RLN monocatenarios sino también con RLN bicatenarios (por ejemplo, nativos). En la porción VHH, se podría conjugar no solo con los terminales N y C sino también con cualquier aminoácido expuesto en la superficie de VHH (con la condición de que tal conjugación no anule por completo la fijación a la albúmina).

[0056] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que las porciones VHH pueden usarse no solo con secuencias de cadena A y cadena B nativas sino también con secuencias modificadas de estas. Además, las porciones VHH pueden modificarse adicionalmente para tener una funcionalidad mejorada o adicional mediante otras fusiones de péptidos/proteínas o la unión de moléculas pequeñas a las porciones VHH.

[0057] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que las porciones VHH proporcionan una duración de acción extendida en mamíferos tales como seres humanos y pueden tener una $t_{1/2}$ de alrededor de 20 días a alrededor de 30 días, lo que permite una administración al menos semanal o quincenal en comparación con RLN humana nativa, especialmente RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6), lo que puede mejorar el cumplimiento.

[0058] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que tienen una selectividad, afinidad y/o potencia similares o mejores para RXFP1 que los receptores RXFP2 en comparación con RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6). Alternativamente, los análogos de RLN de la presente dan como resultado una actividad suficiente en el receptor RXFP1 y una actividad reducida o insuficiente en uno o más de los receptores RXFP2, RXFP3 y RXFP4.

[0059] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que tienen una farmacocinética sintonizable que se logra al cambiar la afinidad de la albúmina de las

porciones VHH.

[0060] Una ventaja de los análogos de RLN de la presente es que tienen una estabilidad mejorada en una formulación conservada en comparación con RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6) o análogos de RLN que tienen una fusión de Fc.

[0061] Además, una ventaja de las porciones VHH es que tienen una fijación igual no solo a la albúmina de suero humano sino también a la albúmina de suero de perros, monos, ratones, cerdos y ratas, lo que permite que los estudios farmacodinámicos, farmacocinéticos y de toxicología se traduzcan más fácilmente de estas especies a seres humanos.

[0062] Una ventaja de las porciones VHH es que no solo pueden usarse para mejorar la $t_{1/2}$ de los análogos de RLN de la presente en comparación con RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6) sino que también pueden usarse para mejorar la $t_{1/2}$ de otros péptidos y proteínas biológicamente activos, por ejemplo, insulina, factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15) o péptido insulínico dependiente de glucosa 1 (GLP-1).

[0063] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona de nivel medio del oficio al que pertenece esta divulgación. Si bien se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la puesta en práctica o en pruebas de los análogos de RLN, las composiciones farmacéuticas y los métodos, en la presente se describen los métodos y materiales preferidos.

[0064] Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya un solo elemento. El artículo indefinido "un" o "una" significan por lo general "al menos uno/a."

[0065] *Definiciones*

[0066] Como se usa en la presente, "alrededor de" significa dentro de un rango estadísticamente significativo de un valor o valores, tales como, por ejemplo, una concentración, longitud, peso molecular, pH, similitud de secuencia, marco de tiempo, temperatura, volumen, etc., indicados. Tal valor o rango puede estar dentro de un orden de magnitud dentro de típicamente 20 %, más típicamente dentro de 10 %, e incluso más típicamente dentro de 5 % de un valor o rango dado. La variación admisible comprendida por "alrededor de" dependerá del sistema particular que se estudie y puede ser determinada con facilidad por una persona del oficio de nivel medio.

[0067] Como se usan en la presente, y en referencia a uno o más de los receptores

RXFP, "actividad", "activar", "activación" y similares significan una capacidad de un compuesto, tal como un análogo de RLN de la presente, para fijarse a e inducir una respuesta en sus receptores, según se mide mediante ensayos conocidos en la técnica, tales como los ensayos *in vitro* que se describen más adelante.

[0068] Como se usa en la presente, "aminoácido" significa una molécula que, desde un punto de vista químico, se caracteriza por la presencia de uno o más grupos amina y uno o más grupos ácido carboxílico, y que puede contener otros grupos funcionales. Como se sabe en la técnica, hay un conjunto de veinte aminoácidos que se denominan aminoácidos estándar y que se pueden usar como bloques de construcción para la mayoría de los péptidos/proteínas producidos por cualquier ser vivo. Las secuencias de aminoácidos en la divulgación contienen los códigos estándar de una letra o tres letras para los veinte aminoácidos estándar.

[0069] Como se usa en la presente, "análogo" significa un compuesto, tal como un péptido o polipéptido sintético, que activa un receptor diana y que provoca al menos un efecto *in vivo* o *in vitro* provocado por un agonista nativo para ese receptor.

[0070] Como se usa en la presente, "sustitución conservadora" significa una variante de un péptido o polipéptido de referencia que es idéntica a la molécula de referencia, excepto por tener una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en su secuencia de aminoácidos. En general, una variante modificada de manera conservadora incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia. Más específicamente, una sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido que tiene características similares (por ejemplo, carga, tamaño de la cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofilia, conformación y rigidez de la cadena principal, etc.) y que tiene un impacto mínimo en la actividad biológica del péptido o polipéptido sustituido resultante. En la técnica se conocen sustituciones conservadoras de aminoácidos funcionalmente similares y, por lo tanto, no es necesario describirlas exhaustivamente en la presente.

[0071] Como se usa en la presente, "cantidad eficaz" significa una cantidad o dosis de uno o más análogos de RLN de la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos que, tras la administración de dosis única o múltiple a un individuo que lo necesite, proporciona un efecto deseado en tal individuo bajo diagnóstico o tratamiento (es decir, puede producir una diferencia medible clínicamente en una afección del individuo tal como, por ejemplo, aumento de la angiogénesis,

aumento del cumplimiento vascular, aumento del flujo sanguíneo cardíaco, aumento del flujo sanguíneo hepático, aumento del flujo sanguíneo pulmonar, aumento del flujo sanguíneo renal, aumento de la tasa de filtración glomerular, disminución de la presión arterial, disminución (o prevención) de la inflamación y/o reducción (o prevención) de la fibrosis en el corazón, riñón, hígado o pulmón). Una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un individuo, se considera una serie de factores que incluyen, entre otros: la especie de mamífero, su tamaño, edad y salud general, la enfermedad o trastorno específico implicado, el grado o la afectación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno, la respuesta del individuo, el análogo de RLN particular administrado, el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la preparación administrada, el régimen de dosis seleccionado, el uso de medicación concomitante, y otras circunstancias relevantes.

[0072] Como se usa en la presente, "duración de acción extendida" significa que la afinidad de fijación y la actividad de un análogo de RLN de la presente continúan por un período de tiempo mayor que una RLN nativa, especialmente RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 and 6), lo que permite una dosificación al menos tan poco frecuente como una vez al día o incluso tres veces a la semana, dos veces a la semana o una vez a la semana. El perfil de acción en el tiempo del análogo de RLN puede medirse mediante métodos de ensayo farmacocinéticos conocidos, tales como los que se utilizan en los ejemplos que figuran más adelante.

[0073] Como se usa en la presente, "semivida" o " $t_{1/2}$ " significa el tiempo que tarda la mitad de una cantidad de un compuesto, tal como RLN nativa o un análogo de RLN de la presente, en ser eliminada de un fluido u otro espacio fisiológico tal como suero o plasma de un individuo por procesos biológicos. Alternativamente, $t_{1/2}$ también puede significar el tiempo que le toma a una cantidad de tal compuesto perder la mitad de su actividad farmacológica, fisiológica o radiológica.

[0074] Como se usa en la presente, "concentración eficaz máxima media" o " EC_{50} " significa una concentración de compuesto que da como resultado una activación/estimulación de 50 % de un criterio de valoración del ensayo, tal como una curva de respuesta a la dosis (por ejemplo, vías de señalización de óxido nítrico (NO), cAMP, PI3K-Akt, NF κ B y/o VEGF).

[0075] Como se usa en la presente, "en combinación con" significa administrar al menos uno de los análogos de RLN de la presente de forma simultánea, secuencial o

en una única formulación combinada con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

[0076] Como se usa en la presente, "individuo que lo necesite" significa un mamífero, tal como un ser humano, con una afección, una enfermedad, un trastorno o un síntoma que requiera terapia o tratamiento, incluso, por ejemplo, los enumerados en la presente. En particular, el individuo a tratar es un ser humano.

[0077] Como se usa en la presente, "de acción prolongada" significa que la afinidad de fijación y la actividad de un análogo de RLN de la presente continúan durante un período de tiempo mayor que RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 and 6), lo que permite una dosificación poco frecuente tal como de una vez al día o incluso tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana o una vez al mes. El perfil de acción en el tiempo de los análogos de RLN puede medirse mediante métodos de ensayo farmacocinéticos conocidos, tales como los que se describen en los ejemplos que se figuran más adelante.

[0078] Como se usa en la presente, "aminoácido no estándar" significa un aminoácido que puede producirse naturalmente en las células pero que no participa en la síntesis de péptidos. Los aminoácidos no estándar pueden ser constituyentes de un péptido y se generan a menudo al modificar aminoácidos estándar en el péptido (es decir, mediante modificación posterior a la traducción). Los aminoácidos no estándar pueden incluir D-aminoácidos, que tienen una quiralidad absoluta opuesta de los aminoácidos estándar anteriores.

[0079] Como se usa en la presente, "amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa cualquiera de los amortiguadores farmacéuticos estándar conocidos por una persona del oficio de nivel medio.

[0080] Como se usa en la presente, "RLN" significa una relaxina obtenida o derivada de cualquier especie, tal como una especie de mamífero, especialmente un ser humano, donde la forma nativa es un péptido heterodimérico que tiene dos cadenas peptídicas (por ejemplo, una cadena A y una cadena B) conectadas mediante dos puentes disulfuro, y en donde la cadena A tiene además un puente disulfuro intramolecular único. RLN incluye tanto RLN nativa (es decir, de longitud completa) como variaciones de esta (es decir, adiciones, eliminaciones, inserciones y/o sustituciones de RLN nativa). En seres humanos, hay tres isoformas nativas de RLN: RLN1, RLN2 y RLN3. El procesamiento de RLN comienza con preprorelaxina, que se procesa hasta obtener prorelaxina (que incluye la cadena A, la cadena B y el péptido C; la RLN nativa tiene una estructura de B-C-A), donde la secuencia de proRLN1 humano nativo se establece en SEQ ID NO:1 (ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt

P04808), la secuencia de proRLN2 humano nativo se establece en SEQ ID NO:4 (ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt P04090), y la secuencia de proRLN3 humano nativo se establece en SEQ ID NO:7 (ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt Q8WXF3). La prorelaxina se somete a un procesamiento adicional en el que el péptido C se escinde para llegar a RLN. Las secuencias para la cadena A de RLN1, RLN2 y RLN3 humanos nativos se exponen en SEQ ID NO:2, 5 y 8, respectivamente. Asimismo, las secuencias para la cadena B de RLN1, RLN2 y RLN3 humanos nativos se exponen en SEQ ID NO:3, 6 y 9, respectivamente.

[0081] En seres humanos, hay cuatro receptores de RLN: RXFP1 (SEQ ID NO:40; ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt Q9HBX9), RXFP2 (SEQ ID NO:41; ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt Q8WXD0), RXFP3 (SEQ ID NO:42; ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt Q9NSD7) y RXFP4 (SEQ ID NO:43; ver también el N.º de acceso a la base de datos de UniProt/SwissProt Q8TDU9), que actúan como GPCR (ver Halls *et al.* (2007) *Br. J. Pharmacol.* 150:677-691). Son de interés en la presente los receptores RXFP1 y RXFP2, los cuales pueden fijarse a RLN1 y RLN2. El receptor RXFP1 se encontró en el cerebro, las células sanguíneas, los huesos, el corazón, los riñones, los pulmones, el hígado y la vasculatura, mientras que el receptor RXFP2 está mucho más restringido y se encontró en los huesos y el gubernáculo. La estimulación de los receptores RXFP1 y RXFP2 activa las redes de transducción de señales que implican adenilato ciclasa, proteína quinasa A, proteína quinasa C, fosfatidilinositol 3-quinasa y/o quinasas reguladas por señal extracelular (Erk1/2).

[0082] Como se usan en la presente, "análogo de RLN" y similares significan un compuesto, tal como un péptido o polipéptido, que provoca uno o más efectos de RLN nativa en uno o más receptores RXFP pero varía de alguna manera con respecto a la secuencia de aminoácidos en comparación con RLN nativa. El análogo de RLN también puede incluir variantes de estos compuestos, que son funcionalmente equivalentes a RLN pero tienen secuencias que son fragmentos o son la secuencia completa pero con adiciones, eliminaciones, inserciones y/o sustituciones. Todas las referencias a las posiciones de aminoácidos en RLN no modificadas o modificadas descritas en la presente son en función de la posición correspondiente en la cadena A de SEQ ID NO:5 o la cadena B de SEQ ID NO:6 de RLN2 humano nativo, a menos que se especifique lo contrario. En algunos casos, los análogos de RLN de la presente pueden fijarse a un RXFP con mayor o menor afinidad, pero demuestran una $t_{1/2}$ más larga *in vivo* o *in vitro*

en comparación con RLN nativa, especialmente una RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6). De esta manera, los análogos de RLN de la presente son compuestos sintéticos que actúan como agonistas del receptor RXFP.

[0083] Como se usa en la presente, "similitud de secuencia" significa una propiedad cuantitativa de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos de compuestos biológicos tales como, por ejemplo, una correspondencia a lo largo de una longitud completa o una ventana de comparación de las dos o más secuencias. La similitud de secuencia puede medirse mediante (1) porcentaje de identidad o (2) porcentaje de similitud. El porcentaje de identidad mide un porcentaje de residuos idénticos entre dos compuestos biológicos divididos por la longitud de la secuencia más corta; mientras que el porcentaje de similitud mide las identidades y, además, incluye espacios de secuencia y similitud de residuos en la evaluación. En la técnica se conocen métodos y algoritmos para determinar la similitud de secuencia y por ende no es necesario describirlos exhaustivamente en la presente. Un porcentaje especificado de posiciones idénticas de nucleótidos o aminoácidos es de al menos alrededor de 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

[0084] Como se usan en la presente, "relaxina monocatenaria", "scRLN" y similares significan un polipéptido de RLN en donde las cadenas A y B están conectadas entre sí por un ligador (es decir, L_2) como en A- L_2 -B o B- L_2 -A. Además, scRLN puede incluir al menos uno de los puentes disulfuro intercatenarios y/o intracatenarios nativos para mantener un plegamiento estructural correcto.

[0085] Como se usa en la presente, "relaxina de dos cadenas", "tcRLN" y similares significan un polipéptido RLN en donde las cadenas A y B están conectadas entre sí por uno o más puentes disulfuro intercatenarios y/o intracatenarios, pero no por ligador alguno, para mantener un plegamiento estructural correcto, tal como una RLN nativa.

[0086] Como se usa en la presente, "que trata" o "tratar" significa manejar y cuidar a un individuo que tiene una afección, una enfermedad, un trastorno o un síntoma para el cual la administración de análogos de RLN está indicada con el propósito de atenuar, restringir, revertir, ralentizar o detener la progresión o gravedad de la afección, enfermedad, trastorno y/o síntoma. El tratamiento incluye administrar de un análogo de RLN de la presente o una composición que contiene un análogo de RLN de la presente al individuo para prevenir la aparición de síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones o eliminar la afección, enfermedad, trastorno o síntoma. El tratamiento incluye la administración de un análogo de RLN o una composición que contiene un

análogo de RLN de la presente al individuo para dar como resultado, por ejemplo, un aumento de la angiogénesis, un aumento del cumplimiento vascular, un aumento del flujo sanguíneo cardíaco, un aumento del flujo sanguíneo hepático, un aumento del flujo sanguíneo pulmonar, un aumento del flujo sanguíneo renal, un aumento de la tasa de filtración glomerular, una disminución de la presión arterial, una disminución (o prevención) de la inflamación y/o una reducción (o prevención) de fibrosis en el corazón, riñón, hígado o pulmón. El individuo a tratar es un mamífero, especialmente un ser humano.

[0087] Como se usan en la presente, "individuo", "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente y significan un mamífero, especialmente un ser humano. En ciertos casos, el individuo se caracteriza además con una afección, una enfermedad, un trastorno y/o un síntoma que se beneficiaría de la administración de un análogo de RLN de la presente.

[0088] Como se usa en la presente, "VHH" o "porción VHH" significa una forma de anticuerpo de dominio único, especialmente un fragmento de anticuerpo de una región variable monomérica única de un anticuerpo solo de cadena pesada (HcAb), que tiene un tamaño muy pequeño de alrededor de 15 kDa. Se descubrió en la presente que se pueden usar porciones VHH como un potenciador farmacocinético para extender la duración de la acción y/o mejorar la $t_{1/2}$ de los análogos de RLN de la presente. Las porciones VHH de la presente se fijan a albúmina de suero; sin embargo, las porciones VHH pueden usarse para la fijación de IgG (incluso el dominio Fc), el receptor de Fc neonatal (FcRn) u otras proteínas en suero de larga duración. Aunque se usan las porciones VHH de la presente para mejorar la $t_{1/2}$ de RLN, también pueden usarse para mejorar la $t_{1/2}$ de otros péptidos/proteínas biológicamente activos, por ejemplo, insulina, GDF-15 o GLP-1.

[0089] Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: "ACR" se refiere a relación de albúmina en orina/creatinina en orina; "amu" se refiere a unidad de masa atómica; "AUC" se refiere a área bajo la curva; "Boc" se refiere a ter-butoxicarbonilo; "cAMP" se refiere a monofosfato de adenosina cíclico; "CMV" se refiere a citomegalovirus; "CV" se refiere a volumen de columna; "ADN" se refiere a ácido desoxirribonucleico; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDC" se refiere a clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EIA/RIA" se refiere a inmunoensayo/radioinmunoensayo enzimático; "ETA" se refiere a etanolamina; "GS" se refiere a glutamina sintetasa; "HIC" se refiere a cromatografía de interacción

hidrófoba; "h" se refiere a hora u horas; "HTRF" se refiere a fluorescencia homogénea con resolución temporal; "IV" se refiere a intravenoso; "IP" se refiere a intraperitoneal; "KDa" se refiere a kilodaltons; "LC/MS" se refiere a cromatografía líquida-espectrometría de masas; "min" se refiere a minuto o minutos; "MS" se refiere a espectrometría de masas; "MSX" se refiere a metionina sulfoximina; "NaOAc" se refiere a acetato de sodio; "NHS" se refiere a N-hidroxisuccinimida; "OtBu" se refiere a O-ter-butilo; "Pbf" se refiere a NG-2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo; "PEI" se refiere a polietilenimina; "RP-HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; "RU" significa unidades de resonancia; "sec" se refiere a segundo o segundos; "SPR" se refiere a resonancia de plasmones superficiales; "SQ" se refiere a subcutáneo; "SEC" se refiere a cromatografía de exclusión por tamaño; "SEM" se refiere a error estándar de la media; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; y "Trt" se refiere a tritilo.

[0090] *Análogos de RLN*

[0091] Los análogos de RLN de la presente tienen similitudes estructurales con la RLN humana nativa, pero también muchas diferencias estructurales. Por ejemplo, cuando se comparan con RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6), los análogos de RLN carecen de uno o más de los aminoácidos presentes en RLN2 humano nativo, que incluyen un ligador peptídico entre la cadena A y la cadena B, e incluyen una porción VHH que se fija a albúmina. Los análogos de RLN dan como resultado una actividad suficiente en el receptor RXFP1 y una actividad reducida o insuficiente en uno o más de los receptores RXFP2, RXFP3 y RXFP4. Del mismo modo, los análogos de RLN tienen atributos beneficiosos relevantes en lo que respecta a su capacidad de desarrollo como tratamientos terapéuticos, que incluyen una mejor solubilidad en soluciones acuosas, una mejor estabilidad química y física de la formulación, un perfil farmacocinético extendido (que puede ajustarse en función de la afinidad de VHH con la albúmina de suero), y/o un potencial minimizado de inmunogenicidad.

[0092] Sucintamente, los análogos de RLN de la presente incluyen una secuencia de aminoácidos desde el terminal N al terminal C que tiene una de las siguientes estructuras:

VHH-L₁-A-L₂-B,
VHH-L₁-B-L₂-A,
A-L₂-B-L₁-VHH, o
B-L₂-A-L₁-VHH,

donde VHH es una porción que actúa como un potenciador farmacocinético, A es una cadena A de RLN, B es una cadena B de RLN, L₁ es un primer ligador peptídico y L₂ es

un segundo ligador peptídico, donde L_1 y L_2 son distintos entre sí (es decir, cada uno tiene una secuencia de aminoácidos que no es la misma).

[0093] Con respecto a la cadena A, puede ser una cadena A de RLN nativa, tal como una cadena A de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:2); cadena A de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5); o cadena A de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:8). Alternativamente, la cadena A puede ser una variante de esta. Por ejemplo, una variante de la cadena A puede tener una secuencia de aminoácidos que carece de los residuos 1 a 4 de SEQ ID NO:5 (es decir, la cadena A de RLN2 humana des1-4 o desA1-4).

[0094] Del mismo modo, y con respecto a la cadena B, puede ser una cadena B de RLN nativa, tal como una cadena B de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:3); cadena B de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:6); o cadena B de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:9). Alternativamente, la cadena B puede ser una variante de esta. Por ejemplo, una variante de la cadena B puede tener una secuencia de aminoácidos que carece del residuo 1 de SEQ ID NO:6 (es decir, cadena B de RLN2 humano des1 o desB1).

[0095] En algunos casos, la cadena A puede ser una cadena A de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:2) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:3); la cadena A puede ser una cadena A de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:6); la cadena A puede ser una cadena A de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:8) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:9); la cadena A puede ser una cadena A de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:2) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:6); la cadena A puede ser una cadena A de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:2) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:9); la cadena A puede ser una cadena A de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:3); la cadena A puede ser una cadena A de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:9); la cadena A puede ser una cadena A de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:8) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN1 humano nativo (SEQ ID NO:3); o la cadena A puede ser una cadena A de RLN3 humano nativo (SEQ ID NO:8) y la cadena B puede ser una cadena B de RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:6).

[0096] En algunos casos, la cadena A puede ser una variante de la cadena A de RLN2 que carece de los residuos 1 a 4 (desA1-4) y la cadena B puede ser cualquier cadena B nativa. En otros casos, la cadena A puede ser cualquier cadena A nativa y la cadena B puede ser una variante de la cadena B de RLN2 que carece del residuo 1 (desB1). En

aun otros casos, la cadena A puede ser una variante de la cadena A de RLN2 que carece de los residuos 1 a 4 (desA1-4) y la cadena B puede ser una variante de la cadena B de RLN2 que carece del residuo 1 (desB1). En ciertos casos, la cadena A es la variante desA1-4. En ciertos casos, la cadena B es la variante desB1.

[0097] Otras cadenas A y B que pueden usarse en los análogos de RLN de la presente se describen en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional N.º WO 2018/148419, WO 2018/138170, WO 2017/201340, WO 2016/149501, WO 2015/157829, WO 2015/067791, WO 2015/067113, WO 2014/102179, WO 2013/177529, WO 2013/007563, WO 2013/004607, WO 2012/031326 y WO 2012/024452; y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2011/0243942. Ver también, Chan *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287:41152-41164; Claasz *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:6287-6293; Hossain *et al.* (2015) *Org. Biomol. Chem.* 13:10895-10890; Hossain *et al.* (2016) *Chem. Sci.* 7:3805-3819; Park *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283:32099-32109 y Wilkinson *et al.* (2005) *BMC Evol. Biol.* 5:14.

[0098] Con respecto a L₁, puede ser un péptido de alrededor de 1 aminoácido a alrededor de 50 aminoácidos. Alternativamente, L₁ puede ser de alrededor de 1, alrededor de 5, alrededor de 10, alrededor de 15, alrededor de 20, alrededor de 25, alrededor de 30, alrededor de 35, alrededor de 40, alrededor de 45 o alrededor de 50 aminoácidos. Alternativamente, L₁ puede ser de alrededor de 5 aminoácidos a alrededor de 10 aminoácidos, de alrededor de 10 aminoácidos a alrededor de 15 aminoácidos, de alrededor de 15 aminoácidos a alrededor de 20 aminoácidos, de alrededor de 20 aminoácidos a alrededor de 25 aminoácidos, de alrededor de 25 aminoácidos a alrededor de 30 aminoácidos, de alrededor de 30 aminoácidos a alrededor de 35 aminoácidos, de alrededor de 35 aminoácidos a alrededor de 40 aminoácidos, de alrededor de 40 aminoácidos a alrededor de 45 aminoácidos o de alrededor de 45 aminoácidos ácidos a alrededor de 50 aminoácidos. En algunos casos, L₁ puede omitirse de manera que la cadena A o la cadena B esté conjugada directamente con la porción VHH. En algunos casos, L₁ puede incluir una secuencia repetitiva de (GGGGQ)_n (SEQ ID NO:14), donde n puede ser de alrededor de 1 a alrededor de 10, especialmente 5 (es decir, (GGGGQ)₅; SEQ ID NO:19). En otros casos, L₁ puede incluir una secuencia repetitiva de (PGPQ)_n (SEQ ID NO:17), donde n puede ser de alrededor de 1 a alrededor de 10, especialmente 8 (es decir, (PGPQ)₈; SEQ ID NO:20). En aun otros casos, L₁ puede incluir una secuencia repetitiva de (PGPA)_n (SEQ ID NO:18), donde n puede ser de alrededor de 1 a alrededor de 10, especialmente 8 (es decir, (PGPA)₈; SEQ ID NO:21).

[0099] Otros ligadores que pueden usarse en los análogos de RLN como L₁ incluyen, entre otros, (GGGQ)_n (SEQ ID NO:15) o (GGGS)_n (SEQ ID NO:16).

[0100] Con respecto a L₂, puede ser un péptido de alrededor de 1 aminoácido a alrededor de 15 aminoácidos. Alternativamente, L₂ puede ser de alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14 o alrededor de 15 aminoácidos. Alternativamente, L₂ puede ser de alrededor de 1 aminoácido a alrededor de 5 aminoácidos, alrededor de 5 aminoácidos a alrededor de 10 aminoácidos, alrededor de 10 aminoácidos a alrededor de 15 aminoácidos, especialmente 10 aminoácidos a 15 aminoácidos. En algunos casos, L₂ puede incluir una mezcla de residuos Ala/A, Gln/Q, Gly/G, Pro/P y Ser/S. En otros casos, L₂ puede ser SEQ ID NO:22, 23 o 67.

[0101] Con respecto a VHH, puede ser un polipéptido de alrededor de 50 aminoácidos a alrededor de 200 aminoácidos, especialmente de alrededor de 125 aminoácidos a alrededor de 150 aminoácidos que pueden fijarse a la albúmina de suero u otra proteína de suero que tenga una t_{1/2} larga. En algunos casos, VHH puede ser cualquiera de SEQ ID NO:10 a 13. Alternativamente, VHH puede ser cualquiera de SEQ ID NO:45-66. Las características estructurales de estas porciones VHH dan como resultado análogos de RLN que tienen una t_{1/2} más larga en comparación con un RLN nativa, especialmente RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6). Dado que las porciones VHH de la presente se dirigen a la albúmina de suero, se puede esperar por ende que la t_{1/2} del análogo de RLN sea similar a la de la albúmina de suero de las especies a las que se administra el análogo de RLN (teniendo en cuenta cualquier disposición de fármaco mediada por la diana).

[0102] Además de los cambios descritos en la divulgación, los análogos de RLN de la presente pueden incluir una o más modificaciones de aminoácidos adicionales, especialmente sustituciones conservadoras, siempre que los análogos de RLN sigan siendo capaces de fijarse a y activar el receptor RXFP1.

[0103] Tomados en conjunto, los análogos de RLN de ejemplo son los siguientes:

Análogo de RLN 1, que incluye una porción VHH (subrayada), un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva), una cadena A de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena B (desB1) de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCT

KRSLARFC**GGGSGGSGGGS**WMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:24), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 2, que incluye una porción VHH (subrayada), un (PGPA)₈ L₁ (en cursiva), una cadena A de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena B (desB1) de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGLTVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCH
VGCTKRSLARFC**GGGSGGSGGGS**WMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:25), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 3, que incluye una porción VHH (subrayada), un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva), una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGLTVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:26), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 4, que incluye una porción VHH (subrayada), un (PGPQ)₈ L₁ (en cursiva), una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGLTVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:27), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 5, que incluye una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita), una cadena A de RLN2, un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva) y una porción VHH (subrayada), tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGLTVTVSSPP (SEQ ID NO:28), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 6, que incluye una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez

residuos (en negrita), una cadena A de RLN2, un (PGPQ)₈ L₁ (en cursiva) y una porción VHH (subrayada), tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFC**PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ**EVQLLESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGLTVTVSSPP

(SEQ ID NO:29), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 7, que incluye una porción VHH (subrayada), un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva), una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGLTVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:30),

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 8, que incluye una porción VHH (subrayada), un (PGPQ)₈-L₁ (en cursiva), una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGLTVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ

ID NO:31), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 9, que incluye una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita), una cadena A de RLN2, un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva) y una porción VHH (subrayada), tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ**EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGLTVTVSSPP (SEQ ID

NO:32), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 10, que incluye una cadena B (desB1) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita), una cadena A de RLN2, un (PGPQ)₈ L₁ (en cursiva) y una porción VHH (subrayada), tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKR

(SEQ ID NO:33), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLPY
WGQGTLLVTVSS**GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ**SWMEEVIKLCGRELVRA
 QIAICGMSTWS**GGGS****GGSGGS****GGG**ALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:34),
 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLPY
WGQGT LVT VSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
 QIAICGMSTWS**GGGS****GGSGGS****GGG**ALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:35),
 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLPY
WGQGTLLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSL
 ARFC**GGGSGGSGGS**SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:36), o
 una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

[illegible]

NO:37), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este;

Análogo de RLN 15, que incluye una porción VHH (subrayada), un (G4Q)₅ L₁ (en cursiva), una cadena B (nativa) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A (nativa) de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGRELV
RAQIAICGMSTWSS**SGGGGSGGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID
NO:38), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este; y

Análogo de RLN 16, que incluye una porción VHH (subrayada), un (PGPA)₈ L₁ (en cursiva), una cadena B (nativa) de RLN2, un L₂ de diez residuos (en negrita) y una cadena A (nativa) de RLN2, tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSS**SGGGGSGGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ
ID NO:39), o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

[0104] La semivida de los análogos de RLN de la presente puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, los descritos en los ejemplos que figuran más adelante. Del mismo modo, la afinidad de los análogos de RLN con albúminas de diferentes especies puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica para medir afinidades de fijación, por ejemplo, los descritos en los ejemplos que figuran más adelante, y se expresa comúnmente como el valor de constante de disociación de equilibrio (K_D). Además, la actividad de los análogos de RLN en cada uno de los receptores RXFP puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los ensayos de actividad *in vitro* descritos más adelante, y se expresa comúnmente como un valor de EC₅₀.

[0105] Como resultado de las modificaciones descritas anteriormente, los análogos de RLN de la presente tienen una t_{1/2} que es más larga que la de una RLN nativa, especialmente RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6), cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano. Como se indicó anteriormente, las porciones VHH de la presente se dirigen a la albúmina de suero; por lo tanto, se puede esperar que la t_{1/2} de los análogos de RLN de la presente sea similar a la de la albúmina de suero de las especies a las que se administra el análogo de RLN. En algunos casos, los análogos de RLN pueden tener una t_{1/2} de alrededor de 1 día a alrededor de 31 días, de

alrededor de 5 días a alrededor de 25 días, de alrededor de 10 días a alrededor de 20 días, o incluso de alrededor de 15 días. En otros casos, los análogos de RLN pueden tener una $t_{1/2}$ de alrededor de 1 día a alrededor de 5 días, de alrededor de 6 días a alrededor de 10 días, de alrededor de 11 días a alrededor de 15 días, de alrededor de 16 días a alrededor de 20 días, de alrededor de 21 a alrededor de 25 días, o incluso de alrededor de 26 a alrededor de 31 días. En otros casos, los análogos de RLN pueden tener una $t_{1/2}$ de alrededor de 1 día, alrededor de 2 días, alrededor de 3 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 7 días, alrededor de 8 días, alrededor de 9 días, alrededor de 10 días, alrededor de 11 días, alrededor de 12 días, alrededor de 13 días, alrededor de 14 días, alrededor de 15 días, alrededor de 16 días, alrededor de 17 días, alrededor de 18 días, alrededor de 19 días, alrededor de 20 días, alrededor de 21 días, alrededor de 22 días, alrededor de 23 días, alrededor de 24 días, alrededor de 25 días, alrededor de 26 días, alrededor de 27 días, alrededor de 28 días, alrededor de 29 días, alrededor de 30 días, o incluso alrededor de 31 días. En casos particulares, los análogos de RLN pueden tener una $t_{1/2}$ de alrededor de 20 días cuando se administran a un ser humano.

[0106] Del mismo modo, los análogos de RLN de la presente tienen una potencia en el receptor RXFP1 dentro de alrededor de 10 veces a alrededor de 100 veces de, por ejemplo, RLN2 humano nativo (SEQ ID NO:5 y 6) cuando se administran a un ser humano.

[0107] *Composiciones y kits farmacéuticos*

[0108] Los análogos de RLN de la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas, que se pueden administrar por vías parenterales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica). Tales composiciones farmacéuticas y las técnicas para prepararlas se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Remington, "The Science and Practice of Pharmacy" (D.B. Troy ed., 21.^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). En casos particulares, los análogos de RLN se administran por vía SQ o IV. Alternativamente, sin embargo, los análogos de RLN pueden formularse en formas para otras vías aceptables desde el punto de vista farmacéuticos tales como, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada y cualquier otra forma utilizada actualmente, que incluye cremas, lociones, inhaladores y similares.

[0109] Como se indicó anteriormente, y para mejorar su compatibilidad y eficacia *in vivo*, los análogos de RLN de la presente pueden hacerse reaccionar con cualquier cantidad de ácidos/bases inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición

ácida/básica aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En la técnica se conocen sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico y técnicas comunes para prepararlas (ver, por ejemplo, Stahl *et al.*, "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" (2.^a edición revisada, Wiley-VCH, 2011)). Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico para su uso en la presente incluyen sales de sodio, trifluoroacetato, clorhidrato y acetato.

[0110] Los análogos de RLN de la presente pueden ser administrados por un médico o autoadministrados mediante una inyección. Se entiende que una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente el tamaño de calibre y la cantidad de volumen de inyección. Sin embargo, la cantidad de volumen de inyección puede ser $\leq$ de alrededor de 2 ml o incluso $\leq$ de alrededor de 1 ml, y el calibre de la aguja puede ser $\geq$ 27 G o incluso $\geq$ 29 G.

[0111] La divulgación también proporciona y por lo tanto abarca novedosos intermediarios y métodos útiles para sintetizar los análogos de RLN de la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos. Los intermediarios y análogos de RLN pueden prepararse mediante una variedad de técnicas que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en los ejemplos a continuación se ilustra un método que utiliza síntesis recombinante. Las etapas específicas para cada una de las técnicas descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar los análogos de RLN. Los reactivos y los materiales de inicio están ampliamente disponibles para las personas del oficio de nivel medio.

[0112] Los análogos de RLN de la presente son generalmente eficaces en un amplio rango de dosis. Las dosis de ejemplo de los análogos de RLN o de las composiciones farmacéuticas que los incluyen pueden ser cantidades en miligramos (mg), microgramos (μ g), nanogramos (ng) o picogramos (pg) por kilogramo (kg) de un individuo. De esta manera, una dosis diaria puede ser de alrededor de 1 μ g a alrededor de 100 mg.

[0113] Aquí, la cantidad eficaz del análogo de RLN en una composición farmacéutica puede ser una dosis de alrededor de 0,25 mg a alrededor de 5,0 mg. Sin embargo, una persona del oficio de nivel medio entiende que en algunos casos la cantidad eficaz (es decir, dosis/dosificación) puede estar por debajo del límite inferior del rango mencionado anteriormente y ser más que adecuada, mientras que en otros casos la cantidad eficaz puede ser una dosis mayor y puede emplearse con efectos secundarios aceptables.

[0114] Además del análogo de RLN de la presente, la composición farmacéutica también puede incluir al menos un agente terapéutico adicional, especialmente un agente terapéutico usado por lo general como el tratamiento de referencia en

afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares, pulmonares y renales.

[0115] De esta manera, una composición farmacéutica puede incluir una cantidad eficaz de al menos un análogo de RLN de la presente, un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:24 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:25 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:26 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:27 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:28 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:29 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:30 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:31 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:32 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:33 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:34 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:35 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:36 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:37 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:38 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico o una cantidad eficaz de un análogo de RLN de SEQ ID NO:39 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0116] Alternativamente, los análogos de RLN de la presente pueden proporcionarse como parte de un kit. En algunos casos, el kit incluye un dispositivo para administrar al menos un análogo de RLN (y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional) a un individuo. En determinados casos, el kit incluye una jeringa y una aguja para administrar el al menos un análogo de RLN (y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional). En casos particulares, el análogo de RLN (y opcionalmente al menos un agente terapéutico adicional) se formula previamente en solución acuosa

dentro de la jeringa.

[0117] *Métodos de elaboración y uso de los análogos de RLN*

[0118] Los análogos de RLN de la presente pueden prepararse mediante cualquier cantidad de métodos estándar de ADN recombinante o métodos estándar de síntesis química de péptidos conocidos en la técnica. Con respecto a los métodos de ADN recombinante, se pueden usar técnicas recombinantes estándar para construir un polinucleótido que tenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una secuencia de aminoácidos para un análogo de RLN, incorporar ese polinucleótido en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como bacterias, levadura y células de mamíferos, para producir el análogo de RLN. Ver, por ejemplo, Green y Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4.^a ed. 2012).

[0119] Con respecto a los métodos de ADN recombinante, los compuestos de la presente pueden prepararse mediante la producción de una proteína o molécula de proteína precursora mediante técnicas de ADN recombinante. El ADN, que incluye cADN y ADN sintético, puede ser bicatenario o monocatenario, y las secuencias de codificación allí contenidas que codifican un compuesto de la presente pueden variar como resultado de la redundancia o degeneración del código genético. Sucintamente, las secuencias de ADN que codifican los compuestos de la presente se introducen en una célula huésped para producir el compuesto o precursor de este. Las células huésped pueden ser células bacterianas, tales como las cepas K12 o B de *Escherichia coli*, células fúngicas, tales como células de levadura, o células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino ("CHO").

[0120] Una célula huésped adecuada se transfecta o transforma de manera transitoria o estable con un sistema de expresión, tal como vectores de expresión, para producir un compuesto de la presente o un precursor de este. Por lo general, los vectores de expresión son replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Normalmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección tales como, por ejemplo, tetraciclina, neomicina, G418 y dihidrofolato reductasa, para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[0121] Las etapas biosintéticas o sintéticas específicas para cada una de las etapas descritas en la presente pueden usarse, no usarse o combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de la presente.

[0122] Con respecto a los métodos de síntesis química de péptidos, se pueden usar

procedimientos de síntesis en fase sólida manuales o automáticos estándar. Por ejemplo, sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles en el comercio a través de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA) y Protein Technologies Inc. (Tucson, AZ). Los reactivos para la síntesis en fase sólida están fácilmente disponibles a través de fuentes comerciales. Los sintetizadores de fase sólida se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante para bloquear grupos interferentes, proteger los aminoácidos durante la reacción, el acoplamiento, la desprotección y la protección de los aminoácidos sin reaccionar. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre la elaboración de RLN sintéticas en las patentes estadounidenses N.º 4.835.251 y 5.166.191.

[0123] Un uso de los análogos de RLN de la presente es para tratar afecciones, enfermedades y/o trastornos cardiovasculares. Las afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares de ejemplo incluyen, entre otros, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca crónica, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias, diabetes, apoplejía, hipercolesterolemia, hipertensión, isquemia, vasoconstricción e hipertrofia ventricular.

[0124] Otro uso de los análogos de RLN de la presente es para tratar afecciones, enfermedades y/o trastornos pulmonares. Las afecciones, enfermedades y trastornos pulmonares de ejemplo incluyen, entre otros, hipertensión pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

[0125] Otro uso de los análogos de RLN de la presente es para tratar afecciones, enfermedades y/o trastornos renales. Las afecciones, enfermedades y trastornos renales de ejemplo incluyen, entre otros, enfermedad renal crónica y nefropatía diabética.

[0126] Los métodos pueden incluir las etapas descritas en la presente, y estas pueden llevarse a cabo, pero no necesariamente, en la secuencia como se describe. Sin embargo, también son concebibles otras secuencias. Además, se pueden llevar a cabo etapas individuales o múltiples en paralelo y/o superpuestas en el tiempo y/o individualmente o en etapas repetidas múltiples. Además, los métodos pueden incluir etapas adicionales no especificadas.

[0127] Por lo tanto, tales métodos pueden incluir la selección de un individuo que tenga una afección, enfermedad o trastorno cardiovascular o que tenga predisposición a este. Alternativamente, los métodos pueden incluir la selección de un individuo que tenga una afección, enfermedad o trastorno pulmonar o que tenga predisposición a este. Alternativamente, los métodos pueden incluir la selección de un individuo que tenga una

afección, enfermedad o trastorno renal o que tenga predisposición a este. En ciertos casos, los métodos pueden incluir seleccionar un individuo que es diabético, hipertenso con insuficiencia renal y/u obeso.

[0128] Los métodos también pueden incluir administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un análogo de RLN de la presente, que puede estar en forma de una composición farmacéutica como también se describe en la presente. En algunos casos, el análogo de RLN/composición farmacéutica puede incluir un agente terapéutico adicional tal como un anticoagulante, un inhibidor de ACE, un ARB, un ARNI, un β bloqueador, un diurético, digitalis, digoxina, dinitrato de hidralazina/isorbida, un MRA u otro antagonista de aldosterona, un inhibidor de SGLT2, una estatina y/o un agente antiglicémico, así como otros agentes terapéuticos para controlar las comorbilidades que incluyen, entre otros, colesterol alto, presión arterial alta, fibrilación auricular y diabetes.

[0129] La concentración/dosis/dosificación del análogo de RLN y el agente terapéutico adicional opcional se analizan en otra parte de la presente.

[0130] Con respecto a una vía de administración, el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye puede administrarse de acuerdo con métodos conocidos tales como, por ejemplo, por vía oral; mediante inyección (es decir, intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraportal o intralesional); mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En ciertos casos, el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye puede administrarse por vía SQ mediante inyección de bolo o de forma continua.

[0131] Con respecto a la frecuencia de dosis, el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye puede administrarse diariamente, día por medio, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana (es decir, semanalmente), quincenalmente (es decir, semana por medio), o mensualmente. En ciertos casos, el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye puede administrarse por vía SQ día por medio, SQ tres veces a la semana, SQ dos veces a la semana, SQ una vez a la semana, SQ semana por medio o SQ mensualmente. En casos particulares, el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye se administra por vía SQ una vez a la semana (QW).

[0132] Con respecto a aquellos casos en los que el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye se administra en combinación con una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional puede

administrarse de manera simultánea, separada o secuencial con el análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye.

[0133] Además, el agente terapéutico adicional puede administrarse con una frecuencia igual que la del análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye (es decir, día por medio, dos veces por semana o incluso semanalmente). Alternativamente, el agente terapéutico adicional puede administrarse con una frecuencia distinta a la del análogo de RLN o la composición farmacéutica que lo incluye. En otros casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse por vía SQ. En otros casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse por vía IV. En aun otros casos, el agente terapéutico adicional puede administrarse por vía oral.

[0134] Se contempla además que los métodos pueden combinarse con dieta y ejercicio y/o pueden combinarse con agentes terapéuticos adicionales distintos de los analizados anteriormente.

EJEMPLOS

[0135] Los siguientes ejemplos no limitativos se ofrecen con fines ilustrativos, no limitativos.

[0136] EXPRESIÓN DE POLIPÉPTIDOS

[0137] Ejemplo 1: Expresión recombinante de análogo de RLN 1

[0138] El Ejemplo 1 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCT
KRSLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
(SEQ ID NO:24).

[0139] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:24 se genera en un sistema de expresión de células de mamífero mediante derivados de células CHOK1. Una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:24 se subclona en una cadena principal de plásmido de expresión que contiene GS (plásmidos a base de pEE12.4). La secuencia de cADN se fusiona en marco con la secuencia codificante de una secuencia de péptido señal, METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:44), para mejorar la secreción del análogo de RLN en el medio de cultivo de tejidos. La expresión es impulsada por el promotor de CMV viral.

[0140] Para generar el análogo de RLN mediante transfección transitoria, se transfectan células CHOK1 con el plásmido de expresión recombinante mediante un

método a base de PEI. Sucintamente, el volumen adecuado de células de suspensión CHOK1 a una densidad de 4×10^6 células/ml se transfiere en matraces de agitación, y se agregan tanto PEI como ADN de plásmido recombinante a las células. Las células se incuban en un cultivo en suspensión a 32 °C durante 6 días. Al final del período de incubación, las células se eliminan por centrifugación a baja velocidad y la proteína de análogo de RLN se purifica del medio acondicionado.

[0141] Alternativamente, y para generar el análogo de RLN a través de transfecciones estables, se transfectan células CHOK1 de manera estable mediante electroporación y la cantidad adecuada de plásmido de expresión recombinante, y las células transfectadas se mantienen en cultivo en suspensión a una densidad celular adecuada. La selección de las células transfectadas se logra mediante el cultivo en medio libre de suero que contiene MSX 25 μ M e incubación a alrededor de 35 °C-37 °C y alrededor de 5 % - 7 % de CO₂.

[0142] El análogo de RLN se segrega en el medio de las células CHO, que se purifica mediante cromatografía de afinidad con proteína A seguida de cromatografía de intercambio iónico e interacción hidrófoba o cromatografía de exclusión por tamaño. Específicamente, el análogo de RLN del medio recolectado se captura en resina de proteína A de Mab Select (GE). Luego, la resina se lava por poco tiempo con un amortiguador de corrida, tal como una solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,4, o un amortiguador de corrida que contiene Tris, para eliminar el material fijado de manera no específica. La proteína se eluye de la resina con una solución de pH bajo, tal como ácido cítrico 10 mM a pH 3. Las fracciones que contienen el análogo de RLN se agrupan y pueden mantenerse a pH bajo para inactivar virus potenciales. El pH puede neutralizarse al agregar una base tal como 0,1 M de Tris pH 8,0. El análogo de RLN puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico con resinas tales como Poros 50 HS (ThermoFisher). El análogo de RLN se eluye de la columna con un gradiente de NaCl 0 mM a NaCl 500 mM en NaOAc 20 mM, pH 5,0, sobre 15 volúmenes de columna.

[0143] El análogo de RLN puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba con una columna HIC Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). La purificación se realiza al ajustar la solución de carga de columna a alrededor de sulfato de sodio 0,5 M y eluir con un gradiente de 10 CV que va de sulfato de sodio 0,5 M a sulfato de sodio 0 M en una solución de Tris 20 mM, pH 8. Después de HIC, el análogo de RLN puede purificarse aun más mediante SEC al cargar el grupo concentrado de Capto Phenyl ImpRes en un Superdex200 (GE Healthcare) con elución

isocrática en PBS a pH 7,4 o en histidina 20 mM, NaCl 50 mM, pH 6,0.

[0144] El análogo de RLN purificado puede pasarse a través de un filtro de retención viral tal como Planova 20N (Asahi Kasei Medical) seguido de concentración/diafiltración en histidina 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6, con ultrafiltración de flujo tangencial en una membrana de celulosa regenerada (Millipore).

[0145] Por lo tanto, el análogo de RLN se prepara de esta manera o de una manera similar que sería fácilmente determinada por una persona del oficio de nivel medio.

[0146] Ejemplo 2: Expresión recombinante de análogo de RLN 2

[0147] El Ejemplo 2 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCH
VGCTKRSLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID
NO:25).

[0148] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:25 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:25 en el plásmido de expresión.

[0149] Ejemplo 3: Expresión recombinante de análogo de RLN 3

[0150] El Ejemplo 3 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
(SEQ ID NO:26).

[0151] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:26 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:26 en el plásmido de expresión.

[0152] Ejemplo 4: Expresión recombinante de análogo de RLN 4

[0153] El Ejemplo 4 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG

RELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:27).

[0154] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:27 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:27 en el plásmido de expresión.

[0155] Ejemplo 5: Expresión recombinante de análogo de RLN 5

[0156] El Ejemplo 5 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAWFRQAPGKEREVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP (SEQ ID
NO:28).

[0157] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:28 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:28 en el plásmido de expresión.

[0158] Ejemplo 6: Expresión recombinante de análogo de RLN 6

[0159] El Ejemplo 6 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLES GGGLVQPGG
SLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKEREVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVTVSSPP
(SEQ ID NO:29).

[0160] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:29 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:29 en el plásmido de expresión.

[0161] Ejemplo 7: Expresión recombinante de análogo de RLN 7

[0162] El Ejemplo 7 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGT LVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
(SEQ ID NO:30).

[0163] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:30 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:30 en el plásmido de expresión.

[0164] Ejemplo 8: Expresión recombinante de análogo de RLN 8

[0165] El Ejemplo 8 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ
ID NO:31).

[0166] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:31 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:31 en el plásmido de expresión.

[0167] Ejemplo 9: Expresión recombinante de análogo de RLN 9

[0168] El Ejemplo 9 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES G GGLVQP G GSLRLSC
AASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID
NO:32).

[0169] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:32 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:32 en el plásmido de expresión.

[0170] Ejemplo 10: Expresión recombinante de análogo de RLN 10

[0171] El Ejemplo 10 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLES G GGLVQP G G
SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP
(SEQ ID NO:33).

[0172] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:33 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica

SEQ ID NO:33 en el plásmido de expresión.

[0173] Ejemplo 11: Expresión recombinante de análogo de RLN 11

[0174] El Ejemplo 11 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO:34).

[0175] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:34 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:34 en el plásmido de expresión.

[0176] Ejemplo 12: Expresión recombinante de análogo de RLN 12

[0177] El Ejemplo 12 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO:35).

[0178] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:35 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:35 en el plásmido de expresión.

[0179] Ejemplo 13: Expresión recombinante de análogo de RLN 13

[0180] El Ejemplo 13 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGSGGSGGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

(SEQ ID NO:36).

[0181] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:36 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:36 en el plásmido de expresión.

[0182] Ejemplo 14: Expresión recombinante de análogo de RLN 14

[0183] El Ejemplo 14 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de aminoácidos de:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQALANKCCHVGC
TKRSLARFCGGGSGGSGGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
(SEQ ID NO:37).

[0184] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:37 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:37 en el plásmido de expresión.

[0185] Ejemplo 15: Expresión recombinante de análogo de RLN 15

[0186] El Ejemplo 15 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de amino de:
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGRELV
RAQIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID
NO:38).

[0187] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:38 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:38 en el plásmido de expresión.

[0188] Ejemplo 16: Expresión recombinante de análogo de RLN 16

[0189] El Ejemplo 16 es un análogo de RLN que tiene una secuencia de amino de:
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ
ID NO:39).

[0190] Aquí, el análogo de RLN de SEQ ID NO:39 se genera esencialmente como se describe para el Ejemplo 1, excepto que se usa una secuencia de cADN que codifica SEQ ID NO:39 en el plásmido de expresión.

[0191] FUNCIÓN *IN VITRO*

[0192] Ejemplo 17: Fijación de albúmina a análogo de RLN mediante SPR

[0193] La fijación *in vitro* de un análogo de RLN a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo se determina mediante SPR. En particular, la afinidad de los análogos de RLN de los

Ejemplos 1 a 14 a la albúmina de suero de estas especies se resume a continuación en las Tablas 1 a 14.

[0194] La fijación de los análogos de RLN de los Ejemplos 1 a 14 a diversas albúminas de suero se lleva a cabo en el instrumento Biacore 8K. La inmovilización de la albúmina de suero en una superficie CM5 de chip sensor serie S se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amine Coupling Kit BR-1000-50). Sucintamente, los grupos carboxilo en las superficies del chip sensor (celdas de flujo 1 y 2) se activan al inyectar 70 µl de una mezcla que contiene 75 mg/ml de EDC y 11,5 mg/ml de NHS a 10 µl/min. Se diluye albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0 (BR-1003-49) a 0,5, 0,5, 2,2, 0,6, 0,6, 0,8, 0,6 y 0,3 µg/ml y luego se la inyecta sobre las superficies de chip activadas (celda de flujo 2, canales de 1 a 8) a 10 µl/min durante 180 segundos (la albúmina de suero humano, de ratón, de rata, de cerdo y de vaca se obtienen de Sigma Aldrich (San Luis, MO); la albúmina de suero de *Macaca fascicularis* se obtiene de Hölzel Diagnostika (Colonia, Alemania); la albúmina de suero de perro se obtiene de Molecular Innovations (Novi, MI); y la albúmina de suero de conejo se obtiene de Fitzgerald Industries Intl. (Acton, MA). Las diversas albúminas de suero se inmovilizan covalentemente a través de aminos libres en un chip sensor recubierto con carboximetil dextrano CM5 en búsqueda de una densidad de superficie de alrededor de 100 (62-145) RU. Los grupos reactivos en exceso en las superficies (celdas de flujo 1 y 2) se desactivan mediante la inyección de 70 µl de ETA HCl-NaOH 1 M, pH 8,5.

[0195] Los análogos de RLN de los Ejemplos 1 a 14 se diluyen en amortiguador HBS-EP+ (HEPES 10 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05 % de polisorbato 20) a concentraciones de 1000, 333,3, 111,1, 37,04, 12,35, 4,12, 1,37, 0,457, 0,152, 0,051 y 0,017 nM. 150 µl de muestra se inyectan de manera individual y secuencial a través de las albúminas de suero inmovilizadas en la superficie del chip y con disociación durante 600 segundos a 50 µl/min de velocidad de flujo a 25 C. La superficie se regenera mediante la inyección de glicina-HCl 10 mM pH 1,5 (BR-1003-54) a 50 µl/min durante 100 segundos. Los sensogramas resultantes se analizan con ajuste de modelo de cinética con fijación 1:1 del *software* Biacore 8K Insight Evaluation (versión 2.0.15.12933) para calcular la velocidad de asociación del parámetro cinético de fijación (k_a), la velocidad de disociación (k_d) y la constante de disociación de equilibrio (K_D).

[0196] Tabla 1: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 1 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	9,8E+05	1,1E-04	1,1E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,1E+06	5,3E-04	5,0E-10
SA de ratón	1,3E+06	4,2E-03	3,3E-09
SA de rata	1,2E+06	2,6E-03	2,1E-09
SA de cerdo	7,8E+05	5,5E-03	7,1E-09
SA de perro	1,3E+06	1,5E-03	1,2E-09
SA de vaca	1,4E+06	5,0E-02	3,7E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0197] K_D se determina como 0,1, 0,5, 3,3, 2,1, 7,1, 1,2 y 37 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 1.

[0198] Tabla 2: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 2 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	9,2E+05	9,5E-05	1,0E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,2E+06	5,2E-04	4,5E-10
SA de ratón	1,1E+06	4,2E-03	3,8E-09
SA de rata	9,8E+05	2,9E-03	3,0E-09
SA de cerdo	6,9E+05	5,6E-03	8,0E-09
SA de perro	1,0E+06	1,5E-03	1,4E-09
SA de vaca	9,8E+05	4,9E-02	5,0E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0199] K_D se determina como 0,1, 0,45, 3,8, 3,0, 8,0, 1,4 y 50 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca Fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 2.

[0200] Tabla 3: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 3 a albúmina de suero humano, de *Macaca Fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,4E+06	1,1E-04	7,6E-11
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,5E+06	5,4E-04	3,6E-10
SA de ratón	1,7E+06	4,0E-03	2,4E-09
SA de rata	1,7E+06	2,7E-03	1,6E-09
SA de cerdo	1,1E+06	5,3E-03	4,8E-09
SA de perro	2,0E+06	1,4E-03	7,0E-10
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		2,6E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0201] K_D se determina como 0,08, 0,36, 2,4, 1,6, 4,8, 0,7 y 26 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 3.

[0202] Tabla 4: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 4 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,2E+06	1,1E-04	8,9E-11
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,3E+06	5,3E-04	4,2E-10
SA de ratón	1,3E+06	3,9E-03	3,0E-09
SA de rata	1,2E+06	2,6E-03	2,1E-09
SA de cerdo	8,6E+05	5,3E-03	6,2E-09
SA de perro	1,4E+06	1,4E-03	1,0E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		3,7E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0203] K_D se determina como 0,09, 0,42, 3,0, 2,1, 6,2, 1,0 y 37 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 4.

[0204] Tabla 5: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 5 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	5,8E+05	2,6E-04	4,5E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	8,2E+05	1,5E-03	1,8E-09
SA de ratón	5,9E+05	8,3E-03	1,4E-08
SA de rata	7,0E+05	7,2E-03	1,0E-08
SA de cerdo	5,8E+05	1,3E-02	2,3E-08
SA de perro	7,1E+05	3,4E-03	4,7E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		1,2E-07
SA de conejo	Sin fijación		

[0205] K_D se determina como 0,45, 1,8, 14, 10, 23, 4,7 y 120 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 5.

[0206] Tabla 6: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 6 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	4,7E+05	2,4E-04	5,1E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	4,3E+05	1,0E-03	2,3E-09
SA de ratón	6,3E+05	7,6E-03	1,2E-08
SA de rata	4,9E+05	4,8E-03	9,7E-09
SA de cerdo	4,1E+05	9,9E-03	2,4E-08
SA de perro	4,8E+05	2,0E-03	4,1E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		1,3E-07
SA de conejo	Sin fijación		

[0207] K_D se determina como 0,51, 2,3, 12, 9,7, 24, 4,1 y 130 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 6.

[0208] Tabla 7: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 7 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,9E+06	1,2E-04	6,3E-11
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	2,1E+06	5,9E-04	2,9E-10
SA de ratón	2,0E+06	4,1E-03	2,1E-09
SA de rata	2,0E+06	2,8E-03	1,4E-09
SA de cerdo	1,5E+06	5,4E-03	3,7E-09
SA de perro	2,2E+06	1,5E-03	6,9E-10
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		2,5E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0209] K_D se determina como 0,06, 0,29, 2,1, 1,4, 3,7, 0,69 y 25 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 7.

[0210] Tabla 8: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 8 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,5E+06	1,1E-04	7,8E-11
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,9E+06	5,9E-04	3,2E-10
SA de ratón	2,2E+06	3,9E-03	1,8E-09
SA de rata	1,6E+06	2,8E-03	1,7E-09
SA de cerdo	1,3E+06	5,2E-03	4,1E-09
SA de perro	2,3E+06	1,5E-03	6,6E-10
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		2,1E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0211] K_D se determina como 0,08, 0,32, 1,8, 1,7, 4,1, 0,66 y 21 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 8.

[0212] Tabla 9: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 9 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	9,5E+05	1,8E-04	1,9E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,1E+06	9,4E-04	8,6E-10
SA de ratón	1,2E+06	1,1E-02	9,5E-09
SA de rata	9,1E+05	7,5E-03	8,2E-09
SA de cerdo	8,7E+05	1,2E-02	1,4E-08
SA de perro	9,5E+05	3,6E-03	3,8E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		8,4E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0213] K_D se determina como 0,19, 0,86, 9,5, 8,2, 14, 3,8 y 84 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 9.

[0214] Tabla 10: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 10 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	5,5E+05	2,0E-04	3,7E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	5,1E+05	7,7E-04	1,5E-09
SA de ratón	7,4E+05	7,2E-03	9,7E-09
SA de rata	6,3E+05	4,9E-03	7,8E-09
SA de cerdo	4,9E+05	9,6E-03	2,0E-08
SA de perro	6,3E+05	2,1E-03	3,4E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		1,0E-07
SA de conejo	Sin fijación		

[0215] K_D se determina como 0,37, 1,5, 9,7, 7,8, 20, 3,4 y 100 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 10.

[0216] Tabla 11: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 11 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,2E+06	2,1E-04	1,7E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,3E+06	6,4E-04	4,8E-10
SA de ratón	1,4E+06	5,0E-03	3,6E-09
SA de rata	2,1E+06	2,8E-03	1,3E-09
SA de cerdo	8,5E+05	6,2E-03	7,3E-09
SA de perro	1,4E+06	1,7E-03	1,3E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		2,7E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0217] K_D se determina como 0,17, 0,48, 3,6, 1,3, 7,3, 1,3 y 27 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 11.

[0218] Tabla 12: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 12 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,4E+06	1,9E-04	1,4E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,5E+06	7,0E-04	4,7E-10
SA de ratón	1,8E+06	4,9E-03	2,6E-09
SA de rata	2,0E+06	3,3E-03	1,7E-09
SA de cerdo	1,4E+06	5,8E-03	4,2E-09
SA de perro	2,1E+06	1,6E-03	7,7E-10
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		3,0E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0219] K_D se determina como 0,14, 0,47, 2,6, 1,7, 4,2, 0,77 y 30 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 12.

[0220] Tabla 13: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 13 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,4E+06	1,9E-04	1,4E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,4E+06	7,0E-04	4,9E-10
SA de ratón	1,8E+06	4,8E-03	2,6E-09
SA de rata	1,7E+06	3,3E-03	2,0E-09
SA de cerdo	1,2E+06	6,0E-03	5,0E-09
SA de perro	1,9E+06	1,7E-03	9,2E-10
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		2,9E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0221] K_D se determina como 0,14, 0,49, 2,6, 2,0, 5,0, 0,92 y 29 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 13.

[0222] Tabla 14: Cinética de fijación del análogo de RLN del Ejemplo 14 a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro, de vaca y de conejo a 25 C.

Fijación a albúminas de suero (SA) inmovilizadas	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
SA humana	1,2E+06	1,9E-04	1,6E-10
SA de <i>Macaca fascicularis</i>	1,1E+06	6,8E-04	6,1E-10
SA de ratón	1,5E+06	4,6E-03	3,1E-09
SA de rata	1,4E+06	3,2E-03	2,2E-09
SA de cerdo	9,7E+05	5,8E-03	6,0E-09
SA de perro	1,5E+06	1,7E-03	1,1E-09
SA de vaca	n/a (estado estacionario)		3,4E-08
SA de conejo	Sin fijación		

[0223] K_D se determina como 0,16, 0,61, 3,1, 2,2, 6,0, 1,1 y 34 nM para la fijación a albúmina de suero humano, de *Macaca fascicularis*, de ratón, de rata, de cerdo, de perro y de vaca, respectivamente, con el análogo de RLN del Ejemplo 14.

[0224] Ejemplo 18: Potencia *in vitro* de análogo de RLN en los receptores RXFP1 y RXFP2

[0225] Generación de línea celular CHO-CRE-Luc: se cultivan células CHO-K1

(ATCC) en DMEM-F12 3:1 con 5 % de FBS con HEPES 20 mM, 40 µg/ml de L-prolina, 1x antibióticos y se las divide a razón de 1:5 cada 2-3 días con TrypLE™ Express (Gibco). Las células se transfectan con ADN de plásmido de pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro] (Promega) y Fugene HD (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionan con higromicina B a 1 mg/ml durante 3-4 semanas. Se obtienen líneas clonales por clonación de dilución limitada en placas de 96 cavidades y se confirman con una respuesta de forskolina mediante un ensayo de luciferasa con reactivo Bright-Glo (Promega). Los clones se expanden, se recolectan, se vuelven a suspender en medios de congelación, se dividen en alícuotas en crioviales y se mantienen en nitrógeno líquido para el almacenamiento a largo plazo. El respondedor superior se selecciona con la mejor respuesta de forskolina (relación de señal con respecto a fondo), línea clonal N.º 2B6, para la transfección posterior con receptores RXFP1 y RXFP2 humanos.

[0226] Generación de líneas celulares que expresan RXFP1 humano y RXFP2 humano de CHO: se cultivan células CHO-CRE-Luc línea N.º 2B6 en DMEM-F12 3:1 con 5 % de FBS con HEPES 20 mM, 40 µg/ml de L-prolina, 1x antibióticos, 1 mg/ml de higromicina B, y se las divide a razón de 1:5 cada 2-3 días con TrypLE Express (Gibco). Las células se transfectan con ADN de plásmido del receptor RXFP1 humano o el receptor RXFP2 humano y Fugene HD (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionan células transfectadas con higromicina B (1 mg/ml) y puromicina (6 µg/ml) durante 3-4 semanas. Se obtienen líneas clonales por clonación de dilución limitada en placas de 96 cavidades. Las líneas clonales están confirmadas por una respuesta de RLN2 humano. Los clones se expanden, se recolectan, se vuelven a suspender en medios de congelación, se dividen en alícuotas en crioviales y se mantienen congelados en nitrógeno líquido para el almacenamiento a largo plazo. Las líneas clonales se seleccionan con la mejor respuesta a RLN2 humano (relación de señal con respecto a fondo) para la validación del ensayo.

[0227] Ensayo de luciferasa de los receptores RXFP1 y RXFP2 humanos: se cultivan líneas celulares CHO que expresan el RXFP1 humano o el RXFP2 humano con medio de selección (DMEM-F12 3:1 con 5 % de FBS con HEPES 20 mM, 40 µg/ml de L-prolina, 1x antibióticos, 6 µg/ml de puromicina, 1 mg/ml de higromicina B). En el día -1 (el día anterior al ensayo de indicador de luciferasa cAMP CRE), las células se lavan una vez con PBS, se elevan de los matraces con solución de disociación celular (solución de disociación celular libre de enzimas, GIBCO N.º de cat. 13151-014:TrypLE™ Express = 30:1), y se vuelven a suspender en medio de colocación en placas (DMEM-F12 3:1

con HEPES 20 mM, 1x antibióticos, 0,5 % de FBS). Las células se colocan en una placa de 96 cavidades (Falcon, N.º de cat. 353219) a 20.000 células/0,1 ml/cavidad. Las células se cultivan a 37 °C, 5 % de CO₂ durante la noche. En el día 1 (el día del ensayo de indicador de luciferasa cAMP CRE), el medio se retira y se reemplaza con 90 µl de medio libre de suero (DMEM-F12 3:1 con 20 mM de HEPES, 1x antibióticos). Las placas se incuban a 37 °C durante 2 horas, luego se agregan 10 µl de ligando 10x (RLN2, final 1x). Las placas se incuban durante 4 horas adicionales a 37 °C. Después de que se completa el período de incubación, las placas se llevan a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se agregan 50 µl de Bright-Glo™ a cada cavidad, y las placas se leen en un lector Biotek Neo2 con el *software* Gen5.

[0228] Análisis estadístico de los datos: los datos se importan del lector Biotek Neo2 al *software* GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; La Jolla, CA; versión 7). Se generan valores de EC₅₀ mediante un análisis de curva de respuesta a la dosis de cuatro parámetros de pendiente variable.

[0229] Tabla 15: Potencia *in vitro* de análogos de RLN a receptores RXFP1 y RXFP2.

Compuesto	SEQ ID NO:	hRXFP1 EC ₅₀ nM GeoMean	SEM	N	hRXFP2 EC ₅₀ nM GeoMean	SEM	N	Relación R2/R1
hRLN2	5 y 6	0,15	0,012	4	1,7	0,45	8	11
Ejemplo 1	24	3,0	2,8	6	65	17	2	22
Ejemplo 2	25	1,1	0,64	6	79	6,2	2	74
Ejemplo 3	26	4,0	1,0	2	19	2,4	4	5
Ejemplo 4	27	2,9	0,2	2	24	6,0	4	8
Ejemplo 5	28	8,1	2,9	2	98	16	4	12
Ejemplo 6	29	15	3,0	2	39	4,9	4	3
Ejemplo 7	30	0,91	0,04	2	26	2,5	4	28
Ejemplo 8	31	2,0	1,2	2	32	14	4	16
Ejemplo 9	32	5,2	0,01	2	97	14	4	19
Ejemplo 10	33	14	0,33	2	32	3,9	4	2
Ejemplo 11	34	3,2	0,69	2	207	31	4	65
Ejemplo 12	35	2,9	0,51	2	193	29	4	66
Ejemplo 13	36	10	0,8	2	407	17	3	42
Ejemplo 14	37	17	2,3	2	628	51	3	37
Ejemplo 15	38	1,7	0,13	5	23	3,6	4	14
Ejemplo 16	39	2,0	0,22	4	70	23	2	35

[0230] FUNCIÓN *IN VIVO*

[0231] Ejemplo 19: Farmacocinética de análogos de RLN en ratas Sprague Dawley macho

[0232] Se administra a ratas Sprague Dawley macho una dosis SQ única de 200 nmol/kg de un análogo de RLN en amortiguador de His-NaCl (pH 6,0) a un volumen de 1,0 ml/kg. La sangre se recolecta 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 240 horas después de la dosis para la caracterización farmacocinética.

[0233] Las concentraciones plasmáticas de los análogos de RLN se determinan mediante un método LC/MS calificado en Eli Lilly and Company. Los compuestos de ejemplo y un estándar interno análogo se extraen de 100 % de plasma de rata con un anticuerpo contra RLN humana seguido de la detección de un péptido triptico de terminal N mediante un espectrómetro de masas Q-Exactive™ Orbitrap®.

[0234] En la Tabla 16 a continuación se proporcionan datos al respecto de los análogos de RLN de los Ejemplos 4 y 7.

[0235] Tabla 16: Media de parámetros farmacocinéticos en plasma al respecto de los análogos de RLN después de una sola dosis SQ de 200 nmol/kg en ratas Sprague Dawley macho.

Compuesto	ID de animal	$t_{1/2}$ (h)	$T_{\text{máx}}$ (h)	$C_{\text{máx}}$ (nmol/l)	$AUC_{0-\text{inf}}$ (h*nmol/l)	CL/F (ml/h/kg)
Ejemplo 4	1	28,0	72	297	35510	5,63
	2	28,8	48	368	37529	5,33
	3	32,8	48	356	39220	5,10
	Media	29,9	56	340	37419	5,35
	SD	2,6	14	38	1857	0,27
Ejemplo 7	1	40,1	48	387	51939	3,85
	2	37,9	72	487	57843	3,46
	3	31,3	48	344	44409	4,50
	Media	36,4	56	406	51397	3,94
	SD	4,6	14	74	6734	0,53

[0236] NOTA: Abreviaturas: $t_{1/2}$ = semivida, $T_{\text{máx}}$ = tiempo hasta la concentración máxima, $C_{\text{máx}}$ = concentración plasmática máxima observada, $AUC_{0-\text{inf}}$ = área bajo la curva desde las 0 horas hasta el infinito, CL/F = depuración/biodisponibilidad, N = 3 animales/grupo/punto de tiempo.

[0237] Como se muestra en la Tabla 16, los análogos de RLN de los Ejemplos 4 y 7 demuestran un perfil farmacocinético extendido en ratas Sprague Dawley.

[0238] Ejemplo 20: Efecto *in vivo* de análogos de RLN en el flujo sanguíneo renal después de la administración IV en ratas Sprague Dawley macho

[0239] Se alojan ratas Sprague Dawley macho de cinco semanas de edad (Charles River Laboratories, Inc.) en un vivero en un ciclo normal de luz/oscuridad durante una semana antes del inicio del experimento. Las ratas luego se aleatorizan a los siguientes grupos de tratamiento: vehículo (amortiguador de His 20 mM/NaCl 20 mM, pH 6,0) y el análogo de RLN del Ejemplo 7 en función del peso corporal. El análogo de RLN se dosifica a 2,44 µg/kg de bolo IV seguidos de 0,36 µg/kg/h de infusión IV, 8,13 µg/kg de bolo IV seguidos de 1,2 µg/kg/h de infusión IV, 24,4 µg/kg de bolo IV seguidos de 3,6 µg/kg/h de infusión IV y 81,3 µg/kg de bolo IV seguidos de 11,9 µg/kg/h de infusión IV.

[0240] Para medir el efecto del análogo de RLN en el flujo sanguíneo renal, las ratas

se anestesian con uretano (1,2 g/kg, IP) y se preparan para diagnóstico por imágenes con ultrasonido abdominal/renal y mediciones de flujo sanguíneo Doppler de onda pulsada en la arteria renal (VisualSonics, sistema de ultrasonido modelo Vevo 3100; Fujifilm). Se coloca un catéter crónico en la vena de la cola para la administración del bolo IV y de infusión. Después de un período de aclimatación de 30 minutos, se obtienen mediciones de flujo sanguíneo renal de valor inicial y 3 horas después del inicio de la dosis.

[0241] Tabla 17: Efecto de análogo de RLN administrado por vía IV sobre el flujo sanguíneo renal en ratas sanas.

Compuesto y Dosis	Tiempo	Flujo sanguíneo renal (ml/min)	Porcentaje de cambio a partir del vehículo (%)
Vehículo a 1,6 ml/kg de bolo IV, luego 0,475 ml/kg/h de infusión IV	valor inicial	8,58 ± 0,16	
	3 h	8,56 ± 0,18	--
Ejemplo 7 a 2,44 µg/kg de bolo IV, luego 0,36 µg/kg/h de infusión IV	valor inicial	8,49 ± 0,31	
	3 h	8,59 ± 0,33	0,4
Ejemplo 7 a 8,13 µg/kg de bolo IV, luego 1,2 µg/kg/h de infusión IV	valor inicial	8,63 ± 0,44	
	3 h	10,84 ± 0,53†*	26,3
Ejemplo 7 a 24,4 µg/kg de bolo IV, luego 3,6 µg/kg/h de infusión IV	valor inicial	8,54 ± 0,23	
	3 h	12,74 ± 0,37†*	48,8
Ejemplo 7 a 81,3 µg/kg de bolo IV, luego 11,9 µg/kg/h de infusión IV	valor inicial	8,34 ± 0,15	
	3 h	13,73 ± 0,47†*	60,4

[0242] NOTA: Los resultados se expresan como media ± SD, † significativamente diferente del valor inicial p<0,001 de ANOVA, * significativamente diferente del vehículo p<0,001 de ANOVA, N = 5 por grupo de tratamiento.

[0243] Como se observa en la Tabla 17, el análogo de RLN del Ejemplo 7 aumenta significativamente el flujo sanguíneo renal en los grupos tratados con 8,13 µg/kg de bolo IV seguidos de 1,2 µg/kg/h de infusión IV, 24,4 µg/kg de bolo IV seguidos de 3,6 µg/kg/h de infusión IV, y 81,3 µg/kg de bolo IV seguidos de 11,9 µg/kg/h de infusión IV a razón

de 26,6, 48,8 y 60,4 % después de 3 h de exposición.

[0244] Ejemplo 21: Efecto *in vivo* de análogos de RLN en el flujo sanguíneo renal después de la administración SQ en ratas Sprague Dawley macho

[0245] Se alojan ratas Sprague Dawley macho de cinco semanas de edad (Charles River Laboratories, Inc.) en un vivero en un ciclo normal de luz/oscuridad durante una semana antes del inicio del experimento. Las ratas luego se aleatorizan a los siguientes grupos de tratamiento: vehículo (amortiguador de His 20 mM/NaCl 20 mM, pH 6,0) y el análogo de RLN del Ejemplo 7 en función del peso corporal. El análogo de RLN se dosifica SQ a 180 µg/kg.

[0246] Para medir el efecto del análogo de RLN en el flujo sanguíneo renal, 48 h después de la dosis las ratas se anestesian con uretano (1,2 g/kg, IP) y se preparan para diagnóstico por imágenes con ultrasonido abdominal/renal y mediciones de flujo sanguíneo Doppler de onda pulsada en la arteria renal (VisualSonics, sistema de ultrasonido modelo Vevo 3100; Fujifilm). Después de un período de aclimatación de 30 minutos, se obtienen las mediciones de flujo sanguíneo renal.

[0247] Tabla 18: Efecto de análogo de RLN administrado por vía SQ sobre el flujo sanguíneo renal en ratas sanas.

Compuesto y Dosis	Flujo sanguíneo renal (ml/min)	Porcentaje de cambio a partir del vehículo (%)
Vehículo a 5 ml/kg	8,51 ± 0,33	--
Ejemplo 7 a 180 µg/kg	11,27 ± 0,81*	32,4

[0248] NOTA: Los resultados se expresan como media ± SD, * significativamente diferente del vehículo $p < 0,001$ de ANOVA, N = 10 por grupo de tratamiento.

[0249] Como se observa en la Tabla 18, el análogo de RLN del Ejemplo 7 aumenta significativamente el flujo sanguíneo renal después de 48 horas de exposición a una dosis SQ de 180 µg/kg.

SECUENCIAS

[0250] Las siguientes secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos se mencionan en la divulgación y se proporcionan a continuación por referencia.

[0251] SEQ ID NO:1 – pro-RLN1 humano

MPRLFLFHLLEFCLLLNQFSRAVAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSL
S
QEDAPQTPRPVAEIVPSFINKDTETIIIMLEFIANLPPELKAALSERQPSLP
ELQQYVPAL
KDSNLSFEEFKKLIRNRQSEAADSNPSELKYLGLDTHSQKKRRPYVALFEK
CCLIGCT
KRSLAKYC

[0252] SEQ ID NO:2 – cadena A de RLN1 humano

PYVALFEKCCLIGCTKRSLAKYC

[0253] SEQ ID NO:3 – cadena B de RLN1 humano

VAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0254] SEQ ID NO:4 – pro-RLN2 humano

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKR
SLS
QEDAPQTPRPVAEIVPSFINKDTETINMMSEFVANLPQELKLTSEMQPALP
QLQQHV
PVLKDSSLLFEEFKKLIRNRQSEAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLY
SALANKCCHV
GCTKRSLARFC

[0255] SEQ ID NO:5 – cadena A de RLN2 humano

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0256] SEQ ID NO:6 – cadena B de RLN2 humano

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0257] SEQ ID NO:7 – pro-RLN3 humano

MARYMLLLLLLAVWVLTGELWPGAEEARAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGS
RWRRSDI
LAHEAMGDTFPDADADEDSLAGELEAMGSSEWLALTKSPQAFYRGRPSWQ
GTPG
VLRGSRDVLAGLSSSCCKWGCSKSEISLC

[0258] SEQ ID NO:8 – cadena A de RLN3 humano
DVLAGLSSSCCKWGCSKSEISLC

[0259] SEQ ID NO:9 – cadena B de RLN3 humano
RAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRW

[0260] SEQ ID NO:10 – porción VHH N.º 1 (C22)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0261] SEQ ID NO:11 – porción VHH N.º 2 (C22.43)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPP

[0262] SEQ ID NO:12 – porción VHH N.º 3 (C80)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0263] SEQ ID NO:13 – porción VHH N.º 4 (C80.43)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPP

[0264] SEQ ID NO:14 – L₁ (secuencia básica de (GGGGQ)_n)
GGGGQ

[0265] SEQ ID NO:15 – L₁ (secuencia básica de (GGGQ)_n)
GGGQ

[0266] SEQ ID NO:16 – L₁ (secuencia básica de (GGGGS)_n)
GGGGS

[0267] SEQ ID NO:17 – L₁ (secuencia básica de (PGPQ)_n)
PGPQ

[0268] SEQ ID NO:18 – L₁ (secuencia básica de (PGPA)_n)
PGPA

[0269] SEQ ID NO:19 – L₁ N.º 1 ((GGGGQ)₅)
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

[0270] SEQ ID NO:20 – L₁ N.º 2 ((PGPQ)₈)
PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ

[0271] SEQ ID NO:21 – L₁ N.º 3 (PGPA)₈
PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPA

[0272] SEQ ID NO:22 – L₂ N.º 1
GGGSGGSGGG

[0273] SEQ ID NO:23 – L₂ N.º 2
GGGSGGSGGSGGG

[0274] SEQ ID NO:24 – análogo de RLN2 N.º 1 (C22-(G4Q)₅-A10B(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCT
KRSLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0275] SEQ ID NO:25 – análogo de RLN2 N.º 2 (C22-(PGPA)₈-A10B(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCH
VGCTKRSLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0276] SEQ ID NO:26 – análogo de RLN2 N.º 3 (C22-(G4Q)₅-B10A(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI

TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGT LTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0277] SEQ ID NO:27 – análogo de RLN2 N.º 4 (C22-(PGPQ)₈-B10A(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGT LTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0278] SEQ ID NO:28 – análogo de RLN2 N.º 5 (B10A(desB1)RLN-(G4Q)₅-C22.43)
SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LTVSSPP

[0279] SEQ ID NO:29 – análogo de RLN2 N.º 6 (B10A(desB1)RLN-(PGPQ)₈-C22.43)
SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGPQPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLES GGGLVQPGG
SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LTVSSPP

[0280] SEQ ID NO:30 – análogo de RLN2 N.º 7 (C80-(G4Q)₅-B10A(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGT LTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0281] SEQ ID NO:31 – análogo de RLN2 N.º 8 (C80-(PGPQ)₈-B10A(desB1)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGT LTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0282] SEQ ID NO:32 – análogo de RLN2 N.º 9 (B10A(desB1)RLN-(G4Q)₅-C80.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTTLTVSSPP

[0283] SEQ ID NO:33 – análogo de RLN2 N.º 10 (B10A(desB1)RLN-(PGPQ)₈-C80.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLESGGGLVQPGG
SLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTTLTVSSPP

[0284] SEQ ID NO:34 – análogo de RLN2 N.º 11 (C22-(G4Q)₅-B13A(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTTLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0285] SEQ ID NO:35 – análogo de RLN2 N.º 12 (C80-(G4Q)₅-B13A(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTTLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0286] SEQ ID NO:36 – análogo de RLN2 N.º 13 (C80-(G4Q)₅-A10B(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTTLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGSGGSGGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0287] SEQ ID NO:37 – análogo de RLN2 N.º 14 (C80-(PGPQ)₈-A10B(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQALANKCCHVGC
TKRSLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0288] SEQ ID NO:38 – análogo de RLN2 N.º 15 (C22-(G4Q)₅-B10ARLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGRELV
RAQIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0289] SEQ ID NO:39 – análogo de RLN2 N.º 16 (C22-(PGPA)₈-B10ARLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCG
RELVRAQIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0290] SEQ ID NO:40 – receptor RXFP1 humano
MTSGSVFFYILIFGKYFSHGGGQDVKCSLGYPFCGNITKCLPQLLHCNGVDDCGNQA
DEDNCGDNNGWSLQFDKYFASYKMTSQYPFEAETPECLVGSVPVQCLCQGLELDC
DETNLRAVPSVSSNVTAMSLQWNLIRKLPPDCFKNYHDLQKLYLQNNKITSISIIYAFRG
LNSLTKLYLSHNRTFLKPGVFEDLHRLEWLIIEDNHLSRISPPTFYGLNSLILLVLMNNV
LTRLDPDKPLCQHMPRLHWLDLEGNHIIHNLRLNLT FISC SNLTVLVMRKNKINHLNENTFA
PLQKLDEL DLGSNKIENLPPLIFKDLKELSQLNLSYNPIQKIQANQFDYLVKLKSLSLEGI
EISNIQQRMFRLMNL SHIYFKKFQYCGYAPHVRSCKPNTDGISSLENLLASIIQRVFV
WVVSATVCFGNIFVICMRPYIRSENKLYAMSII SLCCADCLMGIYLFVIGGF DLKFRGEY
NKHAQLWMESTHCQLVGS LAILSTEVS VLLL TFLTLEKYICIVYPFRCVRPGKCRITVLI
LIWITGFIVAFIPLSNKEFFKNYYGTNGVCFPLHSEDTESIGAQIYSVAIFLGINLA AFIIIVF
SYGSMFYSVHQSAITATEIRNQVKKEMILAKRFFFIVFTDALCWIPFVVKFLSLLQVEIP
GTITSWVIFILPINSALNPILYTLTTRPFKEMIHRFWYNYRQRKSMDSKGQKTYAPSEI
WVEMWPLQEMPPELMKPD LFTYPC EMSLISQSTR LNSYS

[0291] SEQ ID NO:41 – receptor RXFP2 humano
MIVFLVFKHLFSRLITMFFLLHFIVLINVKDFALTQGS MITPSCQKGYFPCGNLT KCLPR
AFHCDGKDDCGNGADEENC GDTSGWATIFGTVHGNANSVALTQECFLKQYPQCCD

CKELETECVNGDLKSVP MISNNVTLLSLKKNKIHS L PDKVFIKYTKLKKIFLQHNCIRHIS
RKAFFGLCNLQILYLNHNCITTLRPGIFKDLHQLTWLILDDNPITRISQRLFTGLNSLFFL
SMVNNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYLTNSTFLSCDSLTVLFLPRNQIGF
VPEKTFSSLKNLGELDLSSNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSNPLMYLHKNQFESLKQ
LQSLDLERIEIPNINTRMFQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLA
NNILRIFVWVIAFITCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDI
KYRGQYQKYALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVSLLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPG
KRQTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGKNGVCFLYYDQTEDIGSKGYSLGIF
LGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCFGREVAVANRFFVFSDAICWIPVF
VVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYLTNTNFFKDKLKQLLHKHQKRSIFKI
KKKSLSTSIVWIEDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPV

[0292] SEQ ID NO:42 – receptor RXFP3 humano

MQMADAATIATMNKAAGGDKLAELFSLVPDLLEAANTSGNASLQLPDLWWELGLELP
DGAPPGHPPGSGGAESADTEARVRILISVVYVWVCALGLAGNLLVLYLMKSMQGWR
KSSINLFVTNLALTDFQFVLTLPFWAVENALDFKWPFGKAMCKIVSMVTSNMNMYASVF
FLTAMSVTRYHSVASALKSHRTRGHGRGDCCGRSLGDSCCFSAKALCVWIWALAAL
ASLPSAIFSTTVKVMGEELCLVRFPDKLLGRDRQFWLGLYHSQKVLLGFVPLPGIIILCY
LLLVRFIADRRRAAGTKGGAAGGRPTGASARRLSKVTKSVTIVVLSFFLCWLPNQAL
TTWSILIKFNAVPPFSQEYFLCQVYAFVSVCLAHSNSCLNPVLYCLVRREFRKALKSLL
WRIASPSITSMRPFTATTKEPEDQGLQAPAPPHAAAEPDLLYPPGVVVYSGGRYD
LLPSSSAY

[0293] SEQ ID NO:43 – receptor RXFP4 humano

MPTLNTSASPPTFFWANASGGSVLSADDAPMPVKFLALRLMVALAYGLVGAIGLLGNL
AVLWVLSNCARRAPGPPSDTFVFNALADLGLALTLPFWAAESALDFHWPFGGALCK
MVL TATVLNVYASIFLITALSVARYWVWAMAAGPGTHLSLFWARIATLAVWAAAALVTV
PTAVFGVEGEVCGVRLCLLRFPSRYWL GAYQLQRVVLAFMVPLGVITTSYLLLLAFLQ
RRQRRRQDSRVVARSVRILVASFFLCWFPNHVVT LWGVLVKFDLVPWNSTFYTIQTY
VFPVTTCLAHSNSCLNPVLYCLLRREPRQALAGTFRDLRLRLWPQGGGWVQQVALK
QVGRRWVASNPRESRPSTLLTNLDRGTPG

[0294] SEQ ID NO:44 – péptido de señal

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[0295] SEQ ID NO:45 – porción VHH N.º 5 (MC6.1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDY
WGQGTLVTVSS

[0296] SEQ ID NO:46 – porción VHH N.º 6 (MC6.1C6)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPY
WGQGTLVTVSS

[0297] SEQ ID NO:47 – porción VHH N.º 7 (C22-G26Y)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0298] SEQ ID NO:48 – porción VHH N.º 8 (C22-R27A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0299] SEQ ID NO:49 – porción VHH N.º 9 (C22-I57E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVD
ETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYP
YWGQGTLVTVSS

[0300] SEQ ID NO:50 – porción VHH N.º 10 (C22-I57Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVD
QTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYP
YWGQGTLVTVSS

[0301] SEQ ID NO:51 – porción VHH N.º 11 (C22-Y59A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0302] SEQ ID NO:52 – porción VHH N.º 12 (C22-Y59E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0303] SEQ ID NO:53 – porción VHH N.º 13 (C22-Y59Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0304] SEQ ID NO:54 – porción VHH N.º 14 (C22-Y59S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0305] SEQ ID NO:55 – porción VHH N.º 15 (C22-Y59T)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0306] SEQ ID NO:56 – porción VHH N.º 16 (C22-R102K)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0307] SEQ ID NO:57 – porción VHH N.º 17 (C22-R102Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0308] SEQ ID NO:58 – porción VHH N.º 18 (C22-R102S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0309] SEQ ID NO:59 – porción VHH N.º 19 (C22-P103E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0310] SEQ ID NO:60 – porción VHH N.º 20 (C22-P103Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRQLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0311] SEQ ID NO:61 – porción VHH N.º 21 (C22-P103S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0312] SEQ ID NO:62 – porción VHH N.º 22 (C22-L104E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0313] SEQ ID NO:63 – porción VHH N.º 23 (C22-L104G)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0314] SEQ ID NO:64 – porción VHH N.º 24 (C22-L104Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0315] SEQ ID NO:65 – porción VHH N.º 25 (C22-L104T)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPITITSKVADLYPY
WGQGTLVTVSS

[0316] SEQ ID NO:66 – porción VHH N.º 26 (C22-S107E)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGR YIDETA VAWFRQ APGKER E FVAGIG GGVDI
TYYADSV KGRFTIS RDNSKNT LYLQMNSL RPEDTA VYYCAAR PGRPLITE KVADLY PY
WGQGTLVTVSS

[0317] SEQ ID NO:67 – L₂ N.º 3

SGGGGSGGGG

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende una estructura de:
VHH-L₁-A-L₂-B,
VHH-L₁-B-L₂-A,
A-L₂-B-L₁-VHH, o
B-L₂-A-L₁-VHH,
en donde VHH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, 11, 12 y 13 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta,
en donde A es una cadena A de relaxina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2, 5 y 8 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta,
en donde B es una cadena B de relaxina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, 6 y 9 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta,
en donde L₁ es un primer ligador que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (GGGGQ)_n (SEQ ID NO:14), (PGPQ)_n (SEQ ID NO:17) y (PGPA)_n (SEQ ID NO:18), y en donde n puede ser de 1 a 10, y
en donde L₂ es un segundo ligador que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:22, 23 y 67; o
una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es SEQ ID NO:2.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde B es SEQ ID NO:3.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es SEQ ID NO:5.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde B es SEQ ID NO:6.
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es SEQ ID NO:5 y carece de los primeros cuatro aminoácidos (desA1-4).
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde B es SEQ ID NO:6 y carece del primer aminoácido (desB1).
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es SEQ ID NO:5 y carece de los primeros cuatro aminoácidos (desA1-4), y en donde B es SEQ ID NO:6 y carece del primer aminoácido (desB1).
9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde A es SEQ ID NO:8.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde B es SEQ ID NO:9.
11. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde L₁ es SEQ ID NO:19.
12. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde L₁ es SEQ ID NO:20.
13. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde L₁ es SEQ ID NO:21.
14. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:24 a 39 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de aquel.
15. Un compuesto que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:24 a 39 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de aquel.
16. Un compuesto que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:24 a 39 o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de aquel.
17. Una composición farmacéutica que comprende:
 - un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este; y
 - un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
18. Un método para tratar afecciones, enfermedades y/o trastornos cardíacos, pulmonares y/o renales en un individuo, en donde el método comprende la etapa de:
 - administrar al individuo una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17.
19. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en un tratamiento.
20. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para uso en el tratamiento de afecciones, enfermedades y/o trastornos cardíacos, pulmonares y/o renales.
21. El uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a

16 para elaborar un medicamento para tratar afecciones, enfermedades y/o trastornos cardíacos, pulmonares y/o renales.

22. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

23. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:11) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

24. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

25. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:13) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

26. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRVTSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

27. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

28. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:47) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

29. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:48) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

30. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI ETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

31. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI QTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:50) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

32. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:51) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

33. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

34. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:53) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

35. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:54) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

36. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:55) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

37. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:56) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

38. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:57) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

39. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:58) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

40. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:59) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

41. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRQLITSKVADLYPY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

42. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPY

WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:61) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

43. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLPHY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

44. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLPHY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:63) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

45. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLPHY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:64) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

46. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLPHY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:65) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

47. Un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDI TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLPHY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66) o una secuencia que tiene al menos 90 % de similitud de secuencia con esta.

RESUMEN

Se divulgan análogos de relaxina (RLN) que incluyen modificaciones que aumentan la semivida en comparación con la RLN humana nativa, que mantienen la selectividad para el receptor RXFP1 y que proporcionan estabilidad *in vitro* e *in vivo* para mejorar las propiedades de farmacología y reducir la inmunogenicidad. También se divulgan composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los análogos de RLN descritos en la presente en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. También se divulgan métodos para elaborar y usar los análogos de RLN, en especial para tratar afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares, pulmonares y/o renales.