

**PÉPTIDOS DE LA CADENA B DE LA RELAXINA LIPIDADOS
MODIFICADOS Y SU USO TERAPÉUTICO**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a análogos peptídicos
5 de la cadena B de la Relaxina-2 capaces de activar el
receptor RXFP1.

En particular, la presente invención se refiere a
análogos peptídicos lipidados de la cadena B de la Relaxina-
2 capaces de activar el receptor RXFP1.

10 Además, la presente invención proporciona composiciones
farmacéuticas que comprenden al menos dichos péptidos, y un
péptido o composición farmacéutica de este de acuerdo con la
invención para su uso como medicamento, y en particular para
su uso en el tratamiento y/o la prevención de diversas
15 enfermedades o afecciones en las que está implicado el
receptor RXFP1, más particularmente una enfermedad o
afección seleccionada entre:

- el grupo constituido por fibrosis; enfermedades
fibróticas, en particular esclerosis sistémica,
20 esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática;
enfermedades renales que cursan con fibrosis; hipertensión
pulmonar y preeclampsia;

- el grupo constituido por enfermedades cardíacas y
vasculares, en particular a partir del grupo constituido por
25 insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia
cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria
arterial, aterosclerosis, angina microvascular y
complicaciones cardiovasculares de la diabetes; y/o

- el grupo constituido por insuficiencias renales, en
30 particular la disfunción renal en la cirrosis, enfermedad
renal crónica y lesión renal aguda.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Relaxina-2 humana (Relaxina H2) es una hormona

peptídica de 6 kDa de 53 aminoácidos. Su estructura está constituida por dos cadenas polipeptídicas separadas, es decir, la cadena A de la Relaxina H2 (SEQ ID NO: 100) y la cadena B de la Relaxina H2 (SEQ ID NO: 101) reticuladas por dos enlaces disulfuro (S-S), con un tercer enlace intracatenario S-S ubicado en la cadena A tal como se indica a continuación:

Cadena A de la Relaxina H2: H-Gln-Leu-Tyr-Ser-Ala-Leu-Ala-Asn-Lys-Cys*-Cys**-His-Val-Gly-Cys*-Thr-Lys-Arg-Ser-
 10 Leu-Ala-Arg-Phe-Cys***-OH (SEQ ID NO: 100)

Cadena B de la Relaxina: H-Asp-Ser-Trp-Met-Glu-Glu-Val-Ile-Lys-Leu-Cys**-Gly-Arg-Glu-Leu-Val-Arg-Ala-Gln-Ile-Ala-Ile-Cys***-Gly-Met-Ser-Thr-Trp-Ser-OH (SEQ ID NO: 101)

donde Cys*, Cys** y Cys*** indican los enlaces disulfuro
 15 entre cisteínas con la misma marca.

La Relaxina-2 es una hormona peptídica de origen natural producida por el *cuerpo lúteo* con un máximo en la circulación durante el primer trimestre de embarazo de una mujer. La Relaxina-2 pertenece a la familia de péptidos insulinoides
 20 cuyos miembros ejercen numerosos efectos después unirse a diferentes tipos de receptores, clasificados como receptores de péptidos de la familia de la Relaxina (RXFP) (RXFP1, RXFP2, RXFP3 y RXFP4).

RXFP1 es el principal receptor de la Relaxina. RXFP1
 25 contiene un dominio extracelular grande con un único módulo de clase A de lipoproteínas de baja densidad (LDLa) en el extremo amino y 10 dominios repetidos ricos en leucina (LRR) extracelulares, seguidos por 7 dominios helicoidales transmembrana (7TM). El módulo LDLa de RXFP1 está ligado al
 30 dominio LRR a través de un conector de 32 residuos.

La activación de RXFP1 es un proceso de múltiples pasos complejo. Unos estudios previos han demostrado que Arg13, Arg17 e Ile20, del casete de arginina (RxxxRxxI/V, donde x

es cualquier residuo) de la cadena B de la Relaxina H2 se unen a Asp231, Asp279, Glu233 y Glu277 ubicados en LRR4-8 del dominio LRR de RXFP1. La unión del ligando por sí sola no es suficiente para activar al receptor. El truncamiento o la sustitución del módulo LDLa da como resultado un receptor inactivo a pesar de la unión al dominio extracelular. Un estudio (Bruell, S. et al., *Front Endocrinol. (Lausana)* 4, 171 (2013)), con un intercambio de los módulos LDLa de RXFP1 y RXFP2, destacó la función del conector en la activación del receptor. Los LRR (sitio de alta afinidad) y los primeros bucles exteriores (sitios de baja afinidad) de los dominios transmembrana participan en la unión a la Relaxina, mientras que el módulo LDLa se necesita para la activación del receptor en la que participa el bucle exterior 2 (Sethi A. et al. *Nature Communications* (2016)).

En algunas especies, la Relaxina también puede activar RXFP2, el GPCR nativo que contiene repeticiones ricas en leucina para el péptido insulinoide 3 (INSL3). Esto sugiere que se podría asociar una reactividad cruzada potencial con las diversas actividades biológicas de la Relaxina, pese a que en la actualidad no se dispone de evidencia de una función fisiológica para la Relaxina actuando únicamente a través de RXFP2.

Unos datos publicados recientemente mostraron que existen diferencias entre especies en la capacidad de los agonistas para activar RXFP1 con una diferencia específica en el dominio ECL3 entre los seres humanos y los roedores (Huang et al. *Frontiers in Endocrinology*, 17 de agosto de 2015;6:128). En paralelo, se ha descrito actividad agonista sesgada para ciertos miméticos monocatenarios derivados de la Relaxina (Hossain et al. *Chem. Sci.*, 2016, 7, 3805). Sin embargo, basándose en la nomenclatura IUPHAR, RXFP1 es un

receptor acoplado a proteínas G y la principal ruta de señalización de RXFP1 conlleva la acumulación de cAMP (monofosfato de adenosina cíclico).

La relaxina se ha identificado en primer lugar como una
5 hormona del embarazo que no participa únicamente en la remodelación del útero y la implantación del embrión, sino también en la adaptación hemodinámica de las mujeres embarazadas. Esto incluye un descenso de la resistencia vascular, un incremento en el gasto cardiaco y un incremento
10 de GFR, una combinación de efectos que tiene como objetivo mejorar la poscarga cardiaca. Estas propiedades han propiciado el uso de Relaxina 2 humana recombinante en varios ensayos clínicos en el contexto de la insuficiencia cardiaca aguda.

15 También se han demostrado los efectos cardiovasculares beneficiosos de la Relaxina, que se atribuyen a alteraciones en la vasculatura renal y sistémica, en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva y aguda en estudios preclínicos y ensayos clínicos de fase II. En ratas macho y
20 hembra hipertensivas y normotensivas conscientes, la administración intravenosa aguda y subcutánea crónica de Relaxina incrementa el gasto cardiaco y la capacitancia arterial global, y reduce la resistencia vascular sistémica, sin afectar a la presión arterial media.

25 También se ha mostrado que la relaxina reduce la presión arterial media en modelos de hipertensión en ratas. Las acciones vasculares de la Relaxina se extienden a la modificación de la capacitancia pasiva de la pared. La infusión subcutánea crónica de Relaxina en ratas y ratones
30 incrementa la capacitancia arterial en arterias pequeñas renales, mesentéricas, uterinas y carótidas. Además, la Relaxina tiene propiedades antifibróticas en un modelo de fibrosis cardiaca y renal en animales.

Por lo tanto, la Relaxina podría ser beneficiosa para pacientes con insuficiencia cardiaca crónica al reducir la poscarga y aliviar la actividad cardiaca, así como también para pacientes con hipertensión pulmonar, con insuficiencia
5 cardiaca con una fracción de eyección reducida o conservada, y para pacientes con enfermedades fibróticas que incluyen la esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad renal que cursa con fibrosis.

Por lo tanto, la Relaxina-2 tiene claramente un elevado
10 interés terapéutico.

No obstante, la estructura heterodimérica compleja de la Relaxina-H2 hace que su síntesis química y purificación sean difíciles lo que conlleva rendimientos bajos del producto final (Curr. Opin. Chem. Biol. 2014, 22, 47-55).

En consecuencia, la obtención de péptidos de Relaxina
15 estables que posean la capacidad de la Relaxina para activar los receptores RXFP1, y más particularmente péptidos que conserven la actividad biológica de la Relaxina, siendo a la vez estructuralmente más simple que la Relaxina nativa,
20 suscita interés.

Los péptidos con estructuras más simples podrían requerir síntesis menos complejas y más eficaces que la Relaxina-H2. De esta manera se reduciría el costo del tratamiento asociado con la síntesis de Relaxina-H2.

Además, debido a su estructura más simple y más pequeña,
25 tales péptidos pueden presentar una captación mejorada en comparación con la Relaxina nativa, lo que conlleva una mejora de la actividad terapéutica *in vivo*.

En la bibliografía se han descrito varios análogos de
30 Relaxina-H2 simplificados. M.A. Hossain et al. (J. Biol. Chem. (2011), 43, 3755) identificaron la estructura mínima de la Relaxina-H2 mostrando que su cadena B se podría truncar en hasta 6 o 7 aminoácidos en el extremo N con una pérdida

mínima de potencia. Las estructuras descritas en esa publicación son análogos de Relaxina bicatenarios que siguen siendo difíciles de sintetizar y no ofrecen ninguna ventaja en comparación con la Relaxina-H2 nativa.

5 Se han realizado más intentos para simplificar los péptidos de la familia de la Relaxina. Recientemente, M.A. Hossain *et al.* en *Chem. Sci.* (2016), 7, 3805-3819 y el documento WO2015/157829 propusieron péptidos agonistas de RXFP1 que comprenden únicamente la cadena B de la Relaxina-
10 H2. Sin embargo, tal como se ilustra en el presente texto, los péptidos del documento WO2015/157829 presentan una capacidad insuficiente para activar el receptor RXFP1.

 Por lo tanto, se necesitan nuevos análogos peptídicos de la cadena B de la Relaxina-2 capaces de activar el
15 receptor RXFP1, en particular, que tengan una capacidad mejorada para activar el receptor RXFP1.

 También se necesitan nuevos péptidos de Relaxina modificados que tengan una estructura simple, en particular una estructura más simple que la de los péptidos de Relaxina
20 que ya se conocen, y que posean una capacidad mejorada para activar el receptor RXFP1.

COMPENDIO DE LA INVENCION

 La presente invención tiene como objetivo cubrir las necesidades que se han indicado anteriormente en este
25 documento.

 De hecho, los inventores proporcionan nuevos péptidos de Relaxina modificados, y en particular péptidos lipidados, que demuestran una mejora significativa de la capacidad para activar el receptor RXFP1 en comparación con los primeros
30 péptidos de la familia de la Relaxina simplificados propuestos en la técnica anterior, tal como se demuestra en los siguientes ejemplos.

 Tal como se describe posteriormente en este documento,

los inventores han introducido varias deleciones y modificaciones en la secuencia aminoacídica de la cadena B de la Relaxina nativa, lo cual da lugar a péptidos más cortos con propiedades mejoradas en comparación con la Relaxina nativa y con los péptidos de Relaxina que ya se había
5 propuesto en la técnica anterior. En particular, los experimentos adjuntos demuestran que mientras que el péptido B7-33 C11.23S (SEQ ID NO: 102) y el péptido análogo del documento WO2015/157829, AcB7-33 C11.23S (SEQ ID NO: 103) y
10 KKKK(AcB7-29 C11.23S) (SEQ ID NO: 104) tienen una concentración para una activación del 50% (CE₅₀) de RXFP1 de 1641 nM, 929 nM y 206 nM, respectivamente, en el ensayo celular utilizado para seleccionar los péptidos de esta invención, los valores de CE₅₀ obtenidos con los péptidos
15 lipidados de acuerdo con la invención van desde 36.4 nM hasta 0.07 nM. Es más, la mayoría de los péptidos de la invención evaluados tienen un valor de CE₅₀ menor o igual a 5 nM.

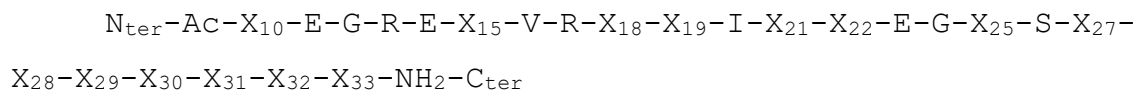
Además, aunque la técnica anterior indicada a continuación sugirió que la cadena B de la relaxina no se
20 podría truncar en más de 7 aminoácidos (J. Biol. Chem. (2011), 43, 3755; documento WO2015/157829) sin una reducción significativa de la potencia, los péptidos de esta invención se truncan en 9 aminoácidos en el extremo N (Nter) y siguen mostrando una actividad alta sobre el receptor RXFP1.

25 En comparación con los péptidos agonistas de RXFP1 del documento WO2015/157829, los péptidos de la invención presentan una solubilidad mejorada a pH 4.5 o pH 7.5, y una estabilidad y semividas *in vivo* en plasma o sangre de rata o humana mejoradas.

30 Estas propiedades permitirán formular los péptidos de esta invención en intervalos de concentración amplios para su uso como medicamento que retendrán su eficacia *in vivo* durante un periodo de tiempo más prolongado, lo cual

permitirá, por ejemplo, su administración en una dosis única diaria por vía intravenosa o subcutánea.

En consecuencia, uno de los objetos de la presente invención se refiere a un péptido que tiene la siguiente fórmula (I):



donde:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

Ac representa un grupo acetilo;

X_{10} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por leucina, ácido 2-aminoisobutírico (Aib), N ϵ -acetillisina (K(Ac)) y α -metilleucina (Mel);

E representa ácido glutámico (Glu);

G representa glicina (Gly);

R representa arginina (Arg);

X_{15} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina (Lys), arginina (Arg), homolisina (Hly), homoarginina (Har), ornitina (Orn), glutamina (Gln), fenilalanina (Phe) y leucina (Leu);

V representa valina (Val);

X_{18} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina (Ala), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), leucina (Leu), N ϵ -acetillisina (K(Ac)) y glutamina (Gln);

X_{19} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina (Lys), N ϵ -acetillisina (K(Ac)), citrulina (Cit), glutamina (Gln), alanina (Ala) y ácido 2-aminoisobutírico (Aib);

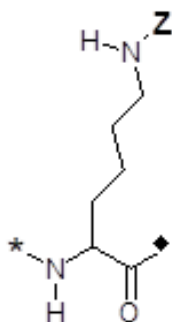
I representa isoleucina (Ile);

X_{21} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico (Aib) y

alanina (Ala);

X₂₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico (Aib) e isoleucina (Ile);

5 X₂₅ representa la siguiente estructura:



en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (I);

10 - ♦ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (I); y

Z representa un grupo de fórmula (II):

-[(PEGxx)_b(gE)_cC_d],

b y c representan independientemente 1, 2, 3, 4 o 5;

15 PEGxx representa independientemente un derivado de polietilenglicol seleccionado a partir del grupo constituido por PEG₂, PEG₂DGA y TTDS;

gE representa ácido gamma-glutámico; y

C_d representa un grupo acilo C₁₂-C₂₂ saturado lineal;

20 S representa serina (Ser);

X₂₇ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por treonina (Thr), lisina (Lys), arginina (Arg) y glutamina (Gln);

25 X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), 5-fluorotriptófano (Trp(5F)), 5-clorotriptófano (Trp(5Cl)), 5-metoxitriptófano (Trp(5OMe)), tirosina (Tyr), 4-

fluorofenilalanina (Pfp),

1-naftilalanina (1-Nal), 2-naftilalanina (2-Nal), α -metiltriptófano (Mtr), α -metilfenilalanina (Mph) y 5-hidroxitriptófano (Wox);

5 X_{29} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por serina (Ser), D-serina (Dser), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), treonina (Thr), α -metilserina (Mse), N ϵ -acetillisina (K(Ac)) y valina (Val);

10 X_{30} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico (Aib), α -metillisina (Mly), D-lisina (Dlys), lisina, homolisina (Hly), ornitina (Orn), arginina (Arg) y α -metilarginina (Mar);

15 X_{31} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por arginina (Arg), N ω -metilarginina (Rme), alanina (Ala), N ω ,N ω' -dimetilarginina (Rds, dimetilarginina simétrica) y citrulina (Cit);

20 X_{32} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina (Lys), alanina (Ala), arginina (Arg), N ϵ -acetillisina (K(Ac)) y N ϵ ,N ϵ ,N ϵ -trimetillisina (Tml); y

25 X_{33} representa un aminoácido seleccionado entre lisina (Lys), N ϵ -acetillisina (K(Ac)), leucina (Leu), arginina (Arg) y alanina (Ala);

o una sal o solvato de este.

En una realización particular, la invención proporciona un péptido que tiene la fórmula (I) o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el péptido es capaz de activar el receptor RXFP1.

30 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de acuerdo con la invención, o un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, junto con al menos un portador

farmacéuticamente aceptable.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un péptido de la invención, un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición
5 farmacéutica de este de acuerdo con la invención, para su uso como medicamento.

En consecuencia, la presente invención se refiere además a un péptido de la invención, un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este o una composición
10 farmacéutica de este de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades o afecciones en las que está implicado el receptor RXFP1, más particularmente en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o afecciones seleccionadas entre:

15 - el grupo constituido por fibrosis; enfermedades fibróticas, en particular esclerosis sistémica, esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades renales que cursan con fibrosis; hipertensión pulmonar y preeclampsia;

20 - el grupo constituido por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria arterial, aterosclerosis, angina microvascular y
25 complicaciones cardiovasculares de la diabetes; y/o

- el grupo constituido por insuficiencias renales en particular la disfunción renal en la cirrosis, enfermedad renal crónica y lesión renal aguda.

En una realización, dicha enfermedad o afección se puede
30 seleccionar a partir del grupo constituido por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad

coronaria arterial, aterosclerosis, angina microvascular y complicaciones cardiovasculares de la diabetes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

5 Tal como se utiliza en la presente:

- "X_y" utilizado en las fórmulas de la invención, donde y tiene diferentes valores, representa un aminoácido como el que se define en la definición de dichas fórmulas. y indica la posición de dicho aminoácido en la cadena B
10 nativa de la Relaxina-2. Por ejemplo, X₁₀ representa el aminoácido en la posición 10 de la secuencia aminoacídica de la cadena B nativa de la Relaxina-2.

- se entiende por "portador farmacéuticamente aceptable" un fluido, especialmente un líquido que comprende
15 un péptido de la invención, tal que la composición farmacéutica sea tolerable desde un punto de vista fisiológico, es decir, se pueda administrar al cuerpo de un individuo sin toxicidad o incomodidad excesiva.

- un péptido "biológicamente activo" de acuerdo con
20 la invención es un péptido capaz de activar el receptor RXFP1.

- Cuando proceda, cada uno de los aminoácidos en los péptidos de la invención puede ser independientemente un L-aminoácido o D-aminoácido. En una realización particular,
25 los aminoácidos de acuerdo con la presente invención son L-aminoácidos. En el presente texto, si no se indica información respecto a la forma L- o D- de un aminoácido concreto, entonces ese aminoácido es un L-aminoácido.

- N_{ter} y C_{ter} son marcas convencionales utilizadas
30 para indicar, respectivamente, el extremo aminoterminal del péptido y el extremo carboxiterminal del péptido de la invención.

- Un "péptido" o "péptido de Relaxina" de acuerdo

con la invención es un péptido de la cadena B de la Relaxina lipidado modificado de acuerdo con la presente invención. En particular, un "péptido" o "péptido de Relaxina" de este tipo se refiere a un péptido que es biológicamente activo, es decir, que muestra una actividad biológica asociada normalmente con la Relaxina y, en particular, que es, tal como se ha indicado anteriormente en este documento, capaz de activar el receptor RXFP1. El nivel de tal actividad biológica de Relaxina mostrada por los péptidos modificados de acuerdo con la invención puede ser equivalente o convenientemente mayor cuando se compara con la actividad de una Relaxina de origen natural o nativa, o incluso cuando se compara con péptidos de Relaxina que ya se han dado a conocer diferentes del de la presente invención.

15 - El término "nativa", tal como se utiliza en el presente texto, en relación con la Relaxina se refiere a moléculas naturales o de origen natural.

20 - Se pretende que "prevenir" signifique reducir el riesgo de que un fenómeno objeto de estudio se manifieste. Esta reducción puede ser total o parcial, es decir, da como resultado un grado de riesgo que es inferior al que existía antes del uso de acuerdo con la invención.

25 - Se pretende que "tratar" signifique reducir o incluso eliminar la afección o enfermedad no deseada objeto de estudio.

30 - "Individuo" o "paciente" se refiere a un mamífero humano o no humano afectado o que es probable que se vea afectado por una afección objeto de estudio de acuerdo con la invención. Dicho individuo es, en particular, un ser humano.

Los presentes inventores han diseñado nuevos péptidos modificados, en particular, péptidos lipidados.

Los inventores han descubierto de manera inesperada en

la presente que un péptido más corto y sumamente modificado de acuerdo con la invención, es decir, una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención, tiene una actividad biológica superior, en particular una capacidad superior para activar el receptor RXFP1 en comparación con una Relaxina de cadena B única conocida en la técnica.

Péptidos de la invención

Los péptidos de acuerdo con la invención se caracterizan por tener la fórmula (I):

10 $N_{ter}-Ac-X_{10}-E-G-R-E-X_{15}-V-R-X_{18}-X_{19}-I-X_{21}-X_{22}-E-G-X_{25}-S-X_{27}-X_{28}-X_{29}-X_{30}-X_{31}-X_{32}-X_{33}-NH_2-C_{ter}$

donde:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

15 Ac representa un grupo acetilo;

X_{10} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por leucina, ácido 2-aminoisobutírico, $N\epsilon$ -acetillisina y α -metilleucina;

E representa ácido glutámico;

20 G representa glicina;

R representa arginina;

X_{15} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, arginina, homolisina, homoarginina, ornitina, glutamina, fenilalanina y leucina;

25 V representa valina;

X_{18} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina, ácido 2-aminoisobutírico, leucina, $N\epsilon$ -acetillisina y glutamina;

30 X_{19} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, $N\epsilon$ -acetillisina, citrulina, glutamina, alanina y ácido 2-aminoisobutírico;

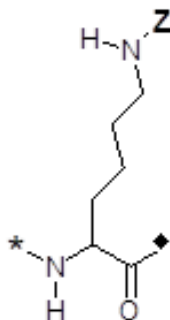
I representa isoleucina;

X_{21} representa un aminoácido seleccionado a partir del

grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y alanina;

X₂₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico e isoleucina;

X₂₅ representa la siguiente estructura:



5

en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (I);

- ♦ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (I); y

Z representa un grupo de fórmula (II):

-[(PEGxx)_b(gE)_cC_d],

b y c representan independientemente 1, 2, 3, 4 o 5;

PEGxx representa independientemente un derivado de polietilenglicol seleccionado a partir del grupo constituido por PEG₂, PEG₂DGA y TTDS;

gE representa ácido gamma-glutámico; y

C_d representa un grupo acilo C₁₂-C₂₂ saturado lineal;

S representa serina;

X₂₇ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por treonina, lisina, arginina y glutamina;

X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por triptófano, fenilalanina, 5-fluorotriptófano, 5-clorotriptófano, 5-metoxitriptófano, tirosina, 4-fluorofenilalanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, α-metiltriptófano,

α -metilfenilalanina y 5-hidroxitriptófano;

X₂₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por serina, D-serina, ácido 2-aminoisobutírico, treonina, α -metilserina, N ϵ -acetillisina y valina;

X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico, α -metillisina, D-lisina, lisina, homolisina, ornitina, arginina y α -metilarginina;

X₃₁ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por arginina, N ω -metilarginina, alanina, N ω ,N ω' -dimetilarginina y citrulina;

X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, alanina, arginina, N ϵ -acetillisina y N ϵ ,N ϵ ,N ϵ -trimetillisina;

X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina, N ϵ -acetillisina, leucina, arginina y alanina;

o una sal o solvato de estos.

La presente invención también incluye sales de los péptidos de las fórmulas (I) o (Ia) definidas en la presente, en una realización, las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales como un aducto ácido con ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido perclórico, ácido tiociánico y ácido bórico; o con un ácido orgánico tal como el ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico y ácido sulfanílico; y sales con metales tales como un metal alcalino, por ejemplo, sodio,

potasio, litio, zinc y aluminio.

En una realización, las sales de los péptidos son sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aductos ácidos con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico y ácido sulfanílico; y sales con metales tales como un metal alcalino, por ejemplo, sodio, potasio, litio y zinc.

La presente invención también incluye solvatos, en una realización, solvatos farmacéuticamente aceptables, de los péptidos de las fórmulas (I) o (Ia) anteriores.

Solvatos se refiere a complejos de los compuestos de la invención o sales de estos con moléculas de disolvente, p. ej., moléculas de disolvente orgánico y/o agua.

De acuerdo con una realización de la invención, la invención también incluye un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de los péptidos de la invención.

Tal como se ilustra, un péptido de acuerdo con la invención es una secuencia de aminoácidos.

Conforme con la nomenclatura de polipéptidos estándar (J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969)), las abreviaturas para los residuos de α -aminoácidos utilizados en la presente invención son de la siguiente manera:

Código de una letra	Código de tres letras	Aminoácido
A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico o

		aspartato
E	Glu	Ácido glutámico o glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

Para aminoácidos no naturales o modificados, se utilizan las siguientes abreviaturas:

Aib	Ácido 2-aminoisobutírico
Cit	Citrulina
Dser	D-serina
Dlys	D-lisina
Har	Homoarginina
Hly	Homolisina
Hph	Homofenilalanina
gE	Ácido γ -glutámico (ácido glutámico conectado por su función γ -ácido carboxílico)
Nle	Norleucina, ácido 2-aminohexanoico

K(Ac)	Nε-Acetillisina, ácido 2-amino-4-acetamidohexanoico
Mar	α-Metilarginina
Mel	α-Metilleucina
Mly	α-Metillisina
Mph	α-Metilfenilalanina
Mse	α-Metilserina
Mtr	α-Metiltriptófano
1-Nal	1-Naftilalanina
2-Nal	2-Naftilalanina
Orn	Ornitina
Pfp	4-Fluorofenilalanina
Rds	Nω,Nω'-dimetilarginina (simétrica)
Rme	Nω-metilarginina
Tml	Nε,Nε,Nε-trimetillisina
Trp(5-Cl) o Trp(5Cl)	5-Clorotriptófano
Trp(5-F) o Trp(5F)	5-Fluorotriptófano
Trp(5-OMe) o Trp(5OMe)	5-Metoxitriptófano
Wox	5-Hidroxitriptófano

En todas las fórmulas de acuerdo con la invención, cuando se representa una secuencia de aminoácidos utilizando las abreviaturas mencionadas anteriormente y representaciones de X_y tales como X_{18} , por ejemplo, la
5 orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi.

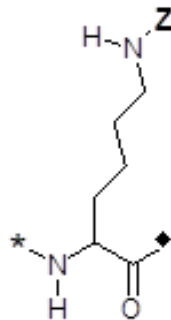
En consecuencia, por ejemplo, si X_{28} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo de triptófano, 5-fluorotriptófano, 5-clorotriptófano, 5-metoxitriptófano,

tirosina, fenilalanina, 4-fluorofenilalanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, α -metiltryptófano, α -metilfenilalanina y 5-hidroxitryptófano, el extremo N o grupo amino de dicho aminoácido está conectado al aminoácido representado por X_{27} y el extremo C o grupo carboxilo de dicho aminoácido está conectado con el aminoácido representado por X_{29} .

En su extremo aminoterminal (N_{ter}), un péptido de la invención está sustituido con un grupo acetilo (Ac): $CH_3C(O)-$.

En su extremo carboxiterminal (C_{ter}), un péptido de la invención está sustituido con un grupo $-NH_2$.

En su posición X_{25} , un péptido de la invención comprende la siguiente estructura:



Esta estructura corresponde a un aminoácido de lisina donde:

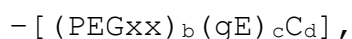
- el átomo de nitrógeno alfa (α) (*) está unido a la parte anterior del péptido, es decir, con el grupo en N_{ter} de X_{25} basándose en la orientación $N_{ter}-C_{ter}$ representada en las fórmulas de acuerdo con la invención, a través de un enlace covalente, en particular a través de un enlace peptídico, es decir, con la glicina en la posición 24 (X_{24});

- el átomo de carbono del grupo carboxilo (♦) está unido a la parte del péptido posterior a la posición X_{25} , es decir, con el grupo en C_{ter} de X_{25} basándose en la orientación $N_{ter}-C_{ter}$ representada en las fórmulas de acuerdo con la

invención, a través un enlace covalente, en particular a través de un enlace peptídico, es decir, con la serina en la posición 26 (X_{26}); y

- el átomo de nitrógeno de su cadena lateral está
5 unido a un grupo Z.

Se define que este grupo Z tiene la fórmula (II):



En la fórmula (II), el - representa un enlace covalente con el átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la
10 estructura de lisina en X_{25} .

b y c representan independientemente 1, 2, 3, 4 o 5, en particular 2, 3, 4 o 5.

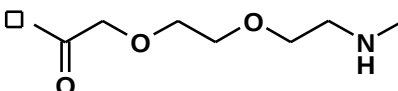
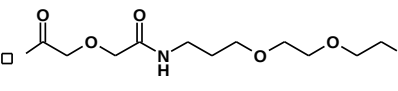
En una realización particular, b representa 2, 3, 4 o 5.

15 En una realización particular, c representa 2, 3 o 4.

En una realización preferida, b representa 2, 3, 4 o 5 y c representa independientemente 2, 3 o 4.

PEG_{xx} en las fórmulas de la invención representa independientemente un derivado de polietilenglicol
20 seleccionado a partir del grupo constituido por PEG₂, PEG₂DGA y TTDS.

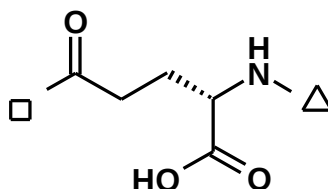
Dichos grupos se definen de la siguiente manera:

Abrevia tura	Estructura	Nombre IUPAC
PEG ₂		2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo
PEG ₂ DGA		2-[2-[3-[2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi]propilamino]-2-oxoetoxi]acetilo

5

10

10



15

20

25

un grupo acilo C_{14} , C_{16} o C_{18} saturado lineal, e incluso más particularmente un grupo acilo C_{16} o C_{18} lineal.

En una realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{12} saturado lineal. Un grupo acilo C_{12} saturado lineal de la invención es un grupo lauroílo (también representado como "Lau" en el presente texto).

En una realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{14} saturado lineal. Un grupo acilo C_{14} saturado lineal de la invención es un grupo miristoílo (también representado como "Mir" en el presente texto).

En una realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{15} saturado lineal. Un grupo acilo C_{15} saturado lineal de la invención es un grupo pentadecanoílo (también representado como "Penta" en el presente texto).

En una realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{16} saturado lineal. Un grupo acilo C_{16} saturado lineal de la invención es un grupo palmitoílo (también representado como "Palm" en el presente texto).

En una realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{17} saturado lineal. Un grupo acilo C_{17} saturado lineal de la invención es un grupo heptadecanoílo (también representado como "Hepta" en el presente texto).

En otra realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{18} saturado lineal. Un grupo acilo C_{18} saturado lineal de la invención es un grupo estearoílo (también representado como "Estea" en el presente texto).

En otra realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{20} saturado lineal. Un grupo acilo C_{20} saturado lineal de la invención es un grupo eicosanoílo (también representado como "Eico" en el presente texto).

En otra realización particular, C_d representa un grupo acilo C_{22} saturado lineal. Un grupo acilo C_{22} saturado lineal de la invención es un grupo docosanoílo (también representado

como "Doco" en el presente texto).

En una realización particular, Z se selecciona del grupo conformado por $-(TTDS)_2-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(TTDS)_2-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(TTDS)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(PEG_2DGA)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(PEG_2DGA)_3-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(PEG_2)_4-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(PEG_2)_4-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(TTDS)_2-(\text{ácido gamma-glutámico})_2\text{-Palmitoílo}$ ($-(TTDS)_2-(gE)_2\text{-Palm}$), $-(TTDS)_2-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Estearoílo}$ ($-(TTDS)_2-(gE)_3\text{-Estea}$), $-(TTDS)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Estearoílo}$ ($-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Estea}$), $-(PEG_2DGA)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Estearoílo}$ ($-(PEG_2DGA)_3-(gE)_3\text{-Estea}$), $-(PEG_2DGA)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_4\text{-Estearoílo}$ ($-(PEG_2DGA)_3-(gE)_4\text{-Estea}$), $-(PEG_2)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(PEG_2)_3-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(PEG_2)_4-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Estearoílo}$ ($-(PEG_2)_4-(gE)_3\text{-Estea}$), $-(PEG_2)_5-(\text{ácido gamma-glutámico})_3\text{-Palmitoílo}$ ($-(PEG_2)_5-(gE)_3\text{-Palm}$), $-(PEG_2)_5-(\text{ácido gamma-glutámico})_4\text{-Palmitoílo}$ ($-(PEG_2)_5-(gE)_4\text{-Palm}$), $-(TTDS)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_4\text{-Estearoílo}$ ($-(TTDS)_3-(gE)_4\text{-Estea}$), $-(TTDS)_2-(\text{ácido gamma-glutámico})_4\text{-Palmitoílo}$ ($-(TTDS)_2-(gE)_4\text{-Palm}$), $-(TTDS)_3-(\text{ácido gamma-glutámico})_2\text{-Estearoílo}$ ($-(TTDS)_3-(gE)_2\text{-Estea}$) y $-(TTDS)_2-(\text{ácido gamma-glutámico})_4\text{-Estearoílo}$ ($-(TTDS)_2-(gE)_4\text{-Estea}$), en una realización más particular, Z se selecciona del grupo constituido por $-(TTDS)_2-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(PEG_2DGA)_3-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(PEG_2)_4-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(TTDS)_2-(gE)_2\text{-Palm}$, $-(TTDS)_2-(gE)_3\text{-Estea}$, $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Estea}$, $-(PEG_2)_3-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(PEG_2)_4-(gE)_3\text{-Estea}$ y $-(TTDS)_2-(gE)_4\text{-Palm}$, en una realización especial, Z se selecciona a partir del grupo constituido por $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Palm}$, $-(TTDS)_2-(gE)_3\text{-Estea}$ y $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Estea}$, por ejemplo, $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Palm}$ y $-(TTDS)_3-(gE)_3\text{-Estea}$.

En todos estos grupos Z, el primer símbolo - representa

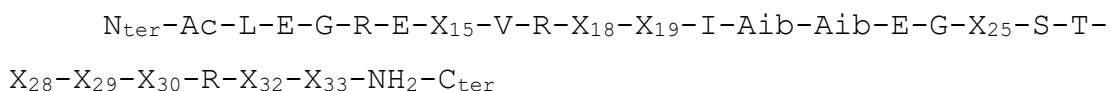
el enlace covalente entre el grupo Z y el átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la estructura de lisina X₂₅.

En consecuencia, cuando el grupo Z se representa, por ejemplo, por -(TTDS)₂-(ácido gamma-glutámico)₃-Palmitoílo (representado también como -(TTDS)₂-(gE)₃-Palm), el primer grupo TTDS está unido al átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la estructura X₂₅. Un enlace covalente también une el segundo grupo TTDS, mientras que otro enlace covalente une este segundo grupo TTDS al primer ácido gamma-glutámico (gE). Este primer ácido gamma-glutámico (gE) se une a su vez a través de un enlace covalente al segundo ácido gamma-glutámico (gE), este segundo ácido gamma-glutámico (gE) se une a través de otro enlace covalente al tercer ácido gamma-glutámico (gE) y este tercer grupo de ácido gamma-glutámico (gE) está conectado además mediante un enlace covalente a un grupo palmitoílo (Palm).

Además, se debe entender a partir de la presente solicitud que un grupo Z de acuerdo con la invención representado, por ejemplo, como -(TTDS)₂-(ácido gamma-glutámico)₃-Palmitoílo (también representado como -(TTDS)₂-(gE)₃-Palm) también se podría haber representado como -TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm.

Esto se aplica, cambiando lo que se deba cambiar, a los otros grupos Z representados de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización particular, un péptido de acuerdo con la invención tiene la fórmula (Ia):



donde:

- N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;
- C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;
- Ac representa un grupo acetilo;
- L representa leucina;

E representa ácido glutámico;

G representa glicina;

R representa arginina;

5 X₁₅ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, arginina, homolisina, glutamina, fenilalanina y leucina;

V representa valina;

X₁₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina y ácido 2-aminoisobutírico;

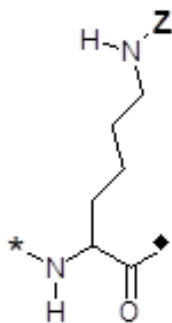
10 X₁₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina,

Nε-acetililisina, glutamina y citrulina;

I representa isoleucina;

Aib representa ácido 2-aminoisobutírico;

15 X₂₅ representa la siguiente estructura:



en la cual:

- * representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (Ia);

20 - ◆ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (Ia); y

Z se selecciona a partir del grupo constituido por:

de un -(TTDS)₂-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₂-
 25 Palm, -(TTDS)₂-(gE)₃-Estea, -(TTDS)₃-(gE)₃-Estea,
 -(PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Estea, -(PEG₂DGA)₃-(gE)₄-Estea, -
 (PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, -(PEG₂)₅-(gE)₃-Palm,

- (PEG₂)₅-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₄-Estea,
 - (TTDS)₂-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₂-Estea y - (TTDS)₂-(gE)₄-Estea, donde

gE representa ácido gamma-glutámico

5 Palm representa Palmítico y

Estea representa Estearóilo;

S representa serina;

T representa treonina;

10 X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por triptófano y fenilalanina;

X₂₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por serina, D-serina y ácido 2-aminoisobutírico;

15 X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico, α-metilisina, D-lisina y lisina;

X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, alanina y arginina; y

20 X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina y Nε-acetilisina;

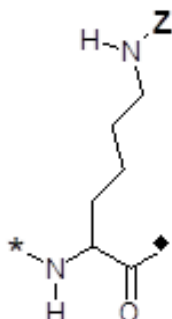
o una sal o solvato de este.

De acuerdo con una realización particular, un péptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de las SEQ ID NO: 1-97. En particular, un péptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de las SEQ ID NO: 1-32, 34-37, 39, 42, 44, 45, 47-49, 51 y 54-97.

En una realización particular para un péptido que tiene la siguiente fórmula (Ia) tal como se ha descrito anteriormente:

X₁₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Nε-acetililisina y citrulina;

X₂₅ representa la siguiente estructura:



5 en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (Ia);

- ◆ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (Ia); y

10 Z se selecciona a partir del grupo constituido por:

de un -(TTDS)₂-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₂-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₃-Estea, -(TTDS)₃-(gE)₃-Estea,

15 -(PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Estea y -(TTDS)₂-(gE)₄-Palm, donde

gE representa ácido gamma-glutámico

Palm representa Palmitoílo y

Estea representa Estearoílo;

20 X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina y alanina; y

X₃₃ representa Nε-acetililisina

o una sal o solvato de este.

De acuerdo con otra realización, un péptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de las SEQ ID NO: 1-30.

En una realización particular, un péptido de acuerdo con la invención de fórmula (Ia) es tal que:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

5 Ac representa un grupo acetilo;

L representa leucina;

E representa ácido glutámico;

G representa glicina;

R representa arginina;

10 X₁₅ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina y homolisina;

V representa valina;

X₁₈ representa alanina;

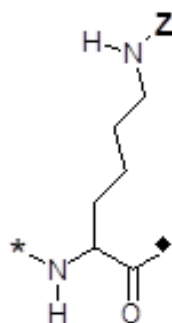
15 X₁₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por

Nε-acetililisina y citrulina;

I representa isoleucina;

Aib representa ácido 2-aminoisobutírico;

X₂₅ representa la siguiente estructura:



20

en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (Ia);

25 - ♦ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (Ia); y

Z se selecciona a partir del grupo constituido por - (TTDS)₂-(gE)₂-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₄-Palm,

- (TTDS)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₃-
 Estea, - (TTDS)₃-(gE)₃-Estea y - (PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, donde

gE representa ácido gamma-glutámico

Palm representa Palmitoílo y

5 Estea representa Estearoílo;

S representa serina;

T representa treonina;

X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por triptófano y fenilalanina;

10 X₂₉ representa serina;

X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y α-
 metillisina;

X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del
 15 grupo constituido por lisina, alanina y arginina; y

X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina
 y Nε-acetillisina;

o una sal o solvato de este.

En una realización especial, un péptido de acuerdo con
 20 la invención de fórmula (Ia) es tal que:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

Ac representa un grupo acetilo;

L representa leucina;

25 E representa ácido glutámico;

G representa glicina;

R representa arginina;

X₁₅ representa lisina;

V representa valina;

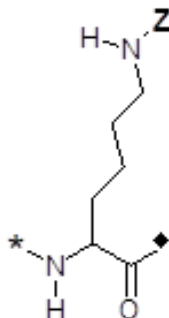
30 X₁₈ representa alanina;

X₁₉ representa Nε-acetillisina;

I representa isoleucina;

Aib representa ácido 2-aminoisobutírico;

X₂₅ representa la siguiente estructura:



en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que
5 precede a X₂₅ en la fórmula (Ia);

- ♦ representa un enlace covalente con la serina que
sigue a X₂₅ en la fórmula (Ia); y

Z se selecciona a partir del grupo constituido por -
(TTDS)₃-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-(gE)₃-
10 Estea y -(PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, donde

gE representa ácido gamma-glutámico

Palm representa Palmitoílo y

Estea representa Estearoílo;

S representa serina;

15 T representa treonina;

X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del
grupo constituido por triptófano y fenilalanina;

X₂₉ representa serina;

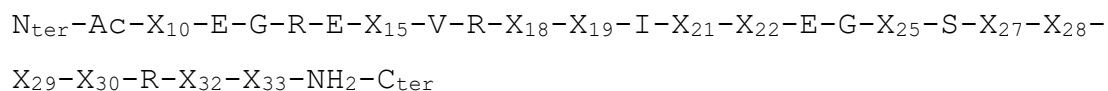
X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del
20 grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y α-
metillisina;

X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del
grupo constituido por lisina, alanina y arginina; y

X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina
25 y Nε-acetillisina;

o una sal o solvato de este.

De acuerdo con una realización particular, un péptido de acuerdo con la invención tiene la fórmula (Ib):



5 donde:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

Ac representa un grupo acetilo;

10 X_{10} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por leucina, Nε-acetililisina y ácido 2-aminoisobutírico;

E representa ácido glutámico;

G representa glicina;

R representa arginina;

15 X_{15} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, arginina, homolisina, glutamina, fenilalanina y leucina;

V representa valina;

20 X_{18} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina, ácido 2-aminoisobutírico y Nε-acetililisina;

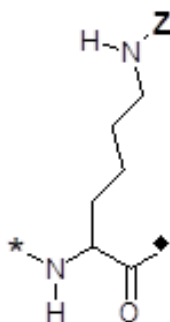
X_{19} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, Nε-acetililisina, glutamina y citrulina;

25 I representa isoleucina;

X_{21} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y alanina;

X_{22} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico e isoleucina;

30 X_{25} representa la siguiente estructura:



en la que:

- * representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (Ib);
- 5 - ◆ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (Ib); y
- Z se selecciona a partir del grupo constituido por un - (TTDS)₂-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₂-Palm,
- 10 - (TTDS)₂-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-(gE)₃-Estea, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Estea, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₄-Estea, - (PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, - (PEG₂)₅-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₅-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₂-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₂-Estea, - (TTDS)₂-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₄-(gE)₃-Estea, -
- 15 (TTDS)₃-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Myr y - (TTDS)₃-(gE)₄-Myr donde
- gE representa ácido gamma-glutámico
- Palm representa Palmitoílo y
- Estea representa Estearoílo;
- 20 S representa serina;
- X₂₇ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por treonina, glutamina, arginina y lisina;
- X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del
- 25 grupo constituido por triptófano, fenilalanina, 5-Clorotriptófano, α-Metilfenilalanina, 4-Fluorofenilalanina y 5-Fluorotriptófano;

X₂₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por serina, D-serina, ácido 2-aminoisobutírico, Nε-acetililisina, treonina y valina; X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico, α-metililisina, D-lisina, lisina, homolisina y arginina; X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, alanina, arginina y Nε-acetililisina; y

10 X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina, Nε-acetililisina y arginina;

o una sal o solvato de este.

En particular, Z se puede seleccionar a partir del grupo constituido por un

15 - (TTDS)₂-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₂-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-(gE)₃-Estea, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Estea, - (PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, - (PEG₂)₅-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₂-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₄-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Myr y - (TTDS)₃-(gE)₄-Myr.

20

En una realización particular de la invención, un péptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID

25 NO: 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 20, 21, 22, 26, 28 y 30.

En una realización particular de la invención, un péptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID

NO: 3, 6, 7, 9-12, 20-22, 26, 28, 30-34, 45, 47-49, 51, 54-

30 62, 64, 67-69, 71-86, 91, 93 y 96. Tal como se ha indicado anteriormente en este documento y como se ilustra en los ejemplos adjuntos, estos péptidos son particularmente convenientes en el sentido de que todos ellos tienen una CE₅₀

menor o igual a 1 nM.

En particular, un péptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID NO: 3, 6, 7, 13, 20, 26 y 30.

5 En particular, un péptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID NO: : 3, 6, 7, 20, 26, 30-34, 45, 48, 49, 51, 54-61, 67, 71, 73, 75-79, 81, 83-86 y 91. Tal como se ilustra en los ejemplos adjuntos, los péptidos de
10 acuerdo con esta realización son particularmente convenientes en el sentido de que todos ellos tienen una CE₅₀ menor o igual a 0.5 nM.

En una realización particular, un péptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a
15 partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 20, y particularmente tiene la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 3.

20 Se puede producir un péptido de la invención mediante cualquier técnica conocida *per se* en la técnica tal como, sin carácter limitante, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o combinada. Sabiendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada,
25 un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos polipéptidos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos, incluso si se utilizan aminoácidos no naturales o de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

30 Por ejemplo, los péptidos de la invención se pueden sintetizar utilizando el conocidísimo método en fase sólida, en particular utilizando un aparato de síntesis peptídica comercializado (tal como el fabricado por Applied

Biosystems, Foster City, California, Gyros Protein technologies, Tucson, Arizona o CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 En los ejemplos adjuntos se ilustran ejemplos de métodos apropiados.

Un péptido de la invención se puede marcar con al menos una molécula o sustancia detectable, en particular seleccionada a partir del grupo constituido por enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales
10 luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos.

Sin embargo, es importante que dicha marca no altere o impida que dicho péptido tenga su actividad biológica de interés tal como se ha definido previamente, es decir, no
15 impida o altere la capacidad del péptido para unirse al receptor RXFP1 y activarlo.

Las moléculas o sustancias detectables preferidas para el soporte de nanomaterial son aquellas que se pueden detectar externamente de manera no invasiva tras la
20 administración *in vivo*.

El experto en la técnica está muy familiarizado con las moléculas o sustancias detectables.

Tales péptidos marcados de la invención se pueden utilizar en un método de diagnóstico y/u obtención de
25 imágenes.

Además, los inventores han observado que la semivida y, en particular, la semivida *in vivo* de los péptidos de la invención es significativamente superior a la de la Relaxina.

30 De hecho, la Relaxina es eliminada rápidamente por el riñón y no se puede utilizar en una situación crónica. La hormona recombinante tiene una semivida *in vivo* muy corta (tal como se ilustra en el mono y ser humano en B.L. Ferraiolo

et al. Pharm.Res. (1991), 8, 1032 y en S.A. Chen *et al.* Pharm. Res. (1993), 10, 834) y requiere suministro intravenoso. De hecho, la semivida de la Relaxina es tan corta que se requeriría una infusión continua durante varias horas en un entorno hospitalario para su administración a un individuo que la necesitara, en particular un individuo que padece una enfermedad o trastorno agudo, tal como, por ejemplo, una insuficiencia cardíaca aguda. El reemplazo de la Relaxina en este tratamiento por péptidos de Relaxina que tienen una mejor semivida *in vivo* permite reemplazar de forma conveniente este tratamiento restrictivo por uno más simple, tal como una única administración diaria por, por ejemplo, vía intravenosa o subcutánea.

En consecuencia, los péptidos de Relaxina de la invención, que poseen la capacidad de la Relaxina para activar RXFP1, y más particularmente péptidos que son agonistas duraderos de RXFP1, tienen el potencial para aplicaciones terapéuticas más amplias que incluyen la insuficiencia cardíaca crónica o aguda.

Composiciones y medicamentos

La presente solicitud también se refiere a un medicamento o una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de la invención tal como se ha descrito anteriormente, o uno de sus solvatos o sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Al menos un péptido de la invención está presente en un medicamento o composición farmacéutica de la invención como principio activo.

Una composición o un medicamento de la invención está en una forma adecuada para la administración a mamíferos.

Una composición o un medicamento de la invención se puede administrar, por ejemplo, por vía oral, parenteral,

intravenosa, rectal, transdérmica, tópica o por inhalación. En particular, una composición de acuerdo con la invención se administra por vía intravenosa o subcutánea.

De acuerdo con una realización particular, el portador farmacéuticamente aceptable de una composición de la invención se selecciona convenientemente a partir del grupo constituido por un líquido portador inyectable tal como agua estéril para inyección; y una solución acuosa tal como solución salina.

Una composición o un medicamento de la invención puede comprender un contenido de péptidos de la invención comprendido entre 0.01 mg/mL y 30 mg/mL, en particular entre 0.3 mg/mL y 3 mg/mL.

Un medicamento o una composición farmacéutica de la invención puede comprender al menos un péptido de la invención como el único principio activo o también puede comprender al menos otro principio activo, siempre que dicho otro principio activo no impida la actividad biológica del péptido de acuerdo con la invención.

Una composición farmacéutica o un medicamento de acuerdo con la invención puede comprender además al menos un antioxidante, dispersante, emulsionante, antiespumante, saborizante, conservante, solubilizante y/o color, siempre que esta/estas sustancias adicionales no impidan las propiedades biológicas de los péptidos de acuerdo con la invención.

Las composiciones estériles de la invención para la administración parenteral pueden ser, en particular, soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas. Los disolventes o vehículos que se pueden utilizar incluyen agua, propilenglicol, un polietilenglicol, aceites vegetales, en particular aceite de oliva, ésteres orgánicos inyectables, por ejemplo, oleato de etilo, u otros

disolventes orgánicos adecuados. Estas composiciones también pueden comprender adyuvantes, en particular agentes humectantes, agentes de tonicidad, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. La esterilización se puede
5 realizar de varias maneras, por ejemplo, mediante filtración aséptica, incorporando agentes esterilizantes en la composición, irradiando o calentando. También se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en el momento de su uso en agua estéril o
10 cualquier otro medio estéril inyectable.

Las composiciones para la administración tópica pueden ser, por ejemplo, gotas nasales o aerosoles.

Para la administración subcutánea, intramuscular o intravenosa, los péptidos de la invención utilizados se
15 convierten, si se desea con las sustancias habituales para este fin, tales como solubilizantes, emulsionantes u otros excipientes, en una solución, suspensión o emulsión. Son ejemplos de disolventes adecuados: el agua, solución salina fisiológica o alcoholes, p. ej., etanol, propanol, glicerol,
20 así como también soluciones de azúcares tales como soluciones de glucosa o manitol, o bien una mezcla de los diferentes disolventes mencionados.

En una realización particular, una composición de la invención, un medicamento de la invención o un péptido de la
25 invención, o uno de sus solvatos o sales farmacéuticamente aceptables, se administra a un individuo por vía parenteral, y en particular se administra por vía transdérmica, intravenosa, subcutánea o intramuscular, en particular por vía intravenosa o subcutánea.

30 Los métodos para preparar composiciones que se pueden administrar por vía parenteral son evidentes para los expertos en la técnica y, por ejemplo, se describen más detalladamente en Remington's Pharmaceutical Science, 15.^a

ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa..

La administración de una composición de la invención o de un péptido de la invención a un individuo puede ser una administración sistémica o una administración localizada en
5 un tejido, órgano y/o sitio del organismo del individuo cuando existe constancia de la presencia de, por ejemplo, una fibrosis, o se espera o es necesario determinarla.

Uso de los péptidos y composiciones

La presente invención se refiere a un péptido de acuerdo
10 con la invención, su solvato o sal farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con la invención, para su uso como medicamento.

Además, la invención también se refiere a una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su
15 uso como medicamento.

Asimismo, la presente invención se refiere a un péptido de la invención, su solvato o sal farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de diversas
20 enfermedades o afecciones en las que está implicado el receptor RXFP1, más particularmente en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o afecciones seleccionadas entre:

- el grupo constituido por fibrosis; enfermedades fibróticas, en particular esclerosis sistémica,
25 esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades renales que cursan con fibrosis; hipertensión pulmonar y preeclampsia;

- el grupo constituido por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por
30 insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria arterial, aterosclerosis, angina microvascular y complicaciones cardiovasculares de la diabetes; y/o

- el grupo constituido por insuficiencias renales, en particular la disfunción renal en la cirrosis; enfermedad renal crónica y lesión renal aguda.

En un aspecto, tal péptido, sal o solvato
5 farmacéuticamente aceptable de este, o composición farmacéutica de acuerdo con la invención, se administra una vez al día, en particular por vía intravenosa o subcutánea.

La dosificación del péptido, o de su solvato o sal farmacéuticamente aceptable, que se va a administrar, y la
10 frecuencia de administración dependen del efecto deseado, la potencia y duración de la acción de los compuestos utilizados; además también de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o afección que se va a tratar y del sexo, edad, peso y capacidad de respuesta individual del mamífero que se
15 va a tratar. En general, el médico determinará la dosificación apropiada en función de la edad y el peso, y todos los otros factores específicos del individuo que se va a tratar.

También se describe un método para la prevención y/o el
20 tratamiento en un individuo de una enfermedad o afección en la que está implicado el receptor de la Relaxina RXFP1 que comprende administrar a dicho individuo al menos un péptido de la invención, una solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica de la
25 invención que comprende al menos un péptido de acuerdo con la invención o una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido de la invención, un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica de la invención que comprende al menos un
30 péptido de acuerdo con la invención.

Tal como se ha indicado previamente, dicha enfermedad o afección se selecciona en particular entre:

- el grupo constituido por fibrosis; enfermedades

fibróticas, en particular esclerosis sistémica, esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades renales que cursan con fibrosis; hipertensión pulmonar y preeclampsia;

5 - el grupo constituido por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria arterial, aterosclerosis, angina microvascular y
10 complicaciones cardiovasculares de la diabetes; y/o

 - el grupo constituido por insuficiencias renales, en particular la disfunción renal en la cirrosis; enfermedad renal crónica y lesión renal aguda.

 Se describe además el uso de al menos un péptido de la
15 invención, un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica de la invención que comprende al menos un péptido de acuerdo con la invención o una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido de la invención, un solvato o sal farmacéuticamente aceptable
20 de este, o una composición farmacéutica de la invención que comprende al menos un péptido de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento en un individuo de una enfermedad o afección que implica el receptor de la relaxina RXFP1.

25 Se describe además el uso de al menos un péptido de acuerdo con la invención, su solvato o sal farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección seleccionada entre:

30 - el grupo constituido por fibrosis; enfermedades fibróticas, en particular esclerosis sistémica, esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades renales que cursan con fibrosis; hipertensión

pulmonar y preeclampsia;

- el grupo constituido por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia
5 cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria arterial, aterosclerosis, angina microvascular y complicaciones cardiovasculares de la diabetes; y/o

- el grupo constituido por insuficiencias renales, en particular la disfunción renal en la cirrosis; enfermedad
10 renal crónica y lesión renal aguda.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, proporcionados simplemente a efectos ilustrativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: síntesis de los péptidos de la invención

Material utilizado

Se utilizaron varias resinas con la amida de rink para la síntesis de péptidos con amidas carboxiterminales de la invención:

20 - resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi, vendida por Chem-Impex; o

- resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)fenoxi acetamido metilo, vendida por Millipore Merck;

Se cargaron en el intervalo de 0.2 a 0.4 mmol.g.

25 Se adquirieron aminoácidos naturales protegidos con Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) de diferentes proveedores, es decir, Protein Technologies Inc., Merck Biosciences, Novabiochem, Iris Biotech, Bachem, Chem-Impex International o MATRIX Innovation.

30 Se utilizaron los siguientes aminoácidos estándar durante las síntesis: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Glu-OtBu, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-

OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-L-Val-OH.

Además, se adquirieron los siguientes aminoácidos
 5 especiales de los mismos proveedores que se ha indicado
 anteriormente: Fmoc-L-hArg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Cit-OH, Fmoc-L-Arg(Me,Pbf)-OH, Fmoc-L-hLys(Boc)-OH, Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-L-Lys(aloc)-OH, Fmoc-L-Lys(Ac)-OH, Fmoc-Aib-OH,
 10 Fmoc-L- α -Me-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L- α -Me-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L- α -Me-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L- α -Me-Leu-OH, Fmoc-L-Nle-OH y Fmoc-L-1-Nal-OH, Fmoc-L-2-Nal-OH Fmoc-5-Wox-OH, Fmoc-Pfp-OH, Fmoc-L- α -Me-Trp-OH, Fmoc-L- α -Me-Phe-OH.

Ac	Acetilo
Aloc	Aliloxicarbonilo
Boc	Tert-Butoxicarbonilo
tBu	Tert-Butilo
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
Dde	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)etilo
ivDde	1-(4,4-Dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo
DCM	Diclorometano
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DIEA, DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DODT	2,2'-(Etilendioxi)dietanotiol
EDT	1,2-Etanoditiol
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonilo
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS,	Triisopropilsilano

TIPS	
HATU	(Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilaminio)
HCTU	Hexafluorofosfato de O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTRF	Fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo
LC/MS	Cromatografía líquida/Espectrometría de masas
Laur	Lauroílo
Mmt	Monometoxitritilo
Mtt	4-Metiltritilo
Myr	Miristoílo
NMP	1-Metilpirrolidin-2-ona
Oxyma	2-Ciano-2-(hidroximino)acetato de etilo (oxyma pure™)
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa
TR	Tiempo de retención
TFA	Ácido trifluoroacético
Trt	Tritilo, trifenilmetilo
UV	Ultravioleta
UPLC	Cromatografía líquida de resolución ultraalta

Para sintetizar los péptidos lipidados de manera carboxiterminal de la invención, se utilizó lisina protegida ortogonalmente tal como se indica posteriormente en este

documento.

1. A. Método general utilizado para sintetizar los péptidos de la invención

Se han sintetizado péptidos de acuerdo con la invención
5 de la secuencia SEQ ID NO: 1-97 basándose en el método representado en las Figuras 1 y 2.

Se introdujeron 0.2 mmol de resina AM con la amida de Rink en un sintetizador de péptidos por microondas Liberty Blue de CEM para ensamblar la secuencia peptídica completa.
10 (véase la Figura 1).

Toda la síntesis se realizó en DMF como disolvente. El péptido se sintetizó utilizando el protocolo de calentamiento estándar para una escala de 0.1 a 0.2 mmol:

Protocolo de calentamiento estándar: irradiación a 170
15 watt, 75 °C, 15 s, después irradiación a 30 watt, 90 °C, 120 s.

La desprotección se realizó con piperidina al 20% v/v en DMF, seguida por 3 pasos de lavado con DMF.

Protocolo de calentamiento para la desprotección:
20 irradiación a 170 watt, 75 °C, 15 s, después irradiación a 30 watt, 90 °C, 50 s.

Los acoplamientos de aminoácidos se realizaron utilizando 5 eq. de Fmoc-AA como soluciones 0.2 M en DMF utilizando 5 eq. de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) 0.5
25 M y 5 eq. de Oxyma (2-ciano-2-(hidroximino)acetato de etilo (oxyma pure™)) 1 M como reactivos de acoplamiento.

Para un mejor rendimiento final, cada aminoácido requirió acoplamientos dobles a 90 °C durante 120 segundos. Para el ácido 2-aminoisobutírico en las posiciones X₂₁ y X₂₂,
30 y la serina en la posición X₂₉ de la fórmula (I) de acuerdo con la invención, se utilizó un acoplamiento triple a 90 °C durante 2 minutos.

En el caso de derivados de aminoácidos costosos, p.

ej., Fmoc- α -metillisina(Boc)-OH, puede ser conveniente realizar un acoplamiento manual utilizando 3 eq. de aminoácido y 3 eq. de reactivo de acoplamiento tal como HATU o HCTU a temperatura ambiente durante de 1 a 18 h o utilizando
5 DIC y Oxyma Pure™ con calentamiento por microondas durante 120 s.

En la posición X₂₅, se utilizó un derivado de Fmoc-lisina-OH que porta en el nitrógeno de la cadena lateral un grupo protector ortogonal. La desprotección selectiva
10 permitió modificar esta cadena lateral del aminoácido.

Al final de la síntesis, se realizó la desprotección de Fmoc manualmente con piperidina al 20% v/v en DMF dos veces 30 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó la acilación en el extremo N mediante
15 tratamiento con 5-10 eq. de anhídrido acético y 5-10 eq. de DIEA en DMF durante 15 min. A continuación, la resina que contenía el péptido totalmente protegido se lavó con DCM/DMF/DCM, 3 veces cada vez y se secó al vacío.

A continuación, el grupo protector en N ϵ de la lisina
20 en la posición X₂₅ (Dde, ivDde, Alloc, o Mtt) se eliminó utilizando hidrazina diluida en DMF (Dde, ivDde), fenilsilano o dimetilaminoborano en presencia de catalizador de paladio (0) en DCM (alloc) o TFA al 1% en DCM (Mtt).

A continuación, se acoplaron los grupos Z al nitrógeno
25 de la cadena lateral de la lisina X₂₅ sobre el soporte sólido de acuerdo con los siguientes pasos:

Cuando la lisina en la posición X₂₅ estaba protegida en su cadena lateral por Dde o iv-Dde, se transfirió la resina-péptido a una jeringa de polipropileno de 50 ml. Se
30 percolaron 80 ml de una solución de hidrazina al 5% en DMF a través de la resina y después se lavó con DMF (3 veces). La reacción se controló mediante la prueba de Kaiser.

Cuando la lisina en la posición X₂₅ estaba protegida en

su cadena lateral con el grupo aliloxycarbonilo (aloc), la resina-péptido se transfirió a una jeringa de polipropileno de 50 ml, y se hinchó en diclorometano y se trató con 20 eq. de fenilsilano (PhSiH_3) (o complejo de borano-dimetilamina ((CH_3)₂NH.BH₃) y piperidina) y 10% (mol/mol) de tetrakis-(trifenilfosfina)paladio ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) durante 2 h en argón. Este tratamiento se repitió hasta que no se pudo detectar el péptido protegido con aloc de partida mediante análisis por UPCL/MS después de la escisión de una parte alícuota de la resina.

Cuando la reacción hubo finalizado, la resina se lavó con diclorometano, DIEA al 1% en DMF, dietilditiocarbamato al 5% en DMF, DMF, DIEA al 10% en DMF, DMF y diclorometano (3 veces cada uno).

Cuando la lisina en la posición X₂₅ estaba protegida en su cadena lateral con el grupo metiltritilo (Mtt), se transfirió resina-péptido a una jeringa de polipropileno de 50 ml y se hinchó en diclorometano y se trató con 10 mL de mezcla (88/5/2) de DCM/TIS/TFA. Tras agitar 1 h, el disolvente se drenó, la resina se lavó con DCM, se agitó con 10 ml de mezcla (90/10) de DCM/DIEA y se lavó varias veces con DCM.

El(los) grupo(s) PEG_{xx} del grupo Z se introdujo(introdujeron), cuando procedió para un péptido dado de la invención, mediante una única acilación con 3 eq de Fmoc-PEG_{xx}-OH durante 18 h con 3 eq de DIC y 3 eq de HOAt, controlando las reacciones con la prueba de la ninhidrina (Kaiser). A continuación, la resina se trató con piperidina al 20% v/v en DMF para eliminar el grupo protector Fmoc (2 x 30 min) y se lavó 3 veces con DMF. Los pasos de acoplamiento de Fmoc-PEG_{xx}-OH, eliminación de Fmoc y lavado se repitieron x veces (x = 0 - 5).

A continuación, se introdujo Fmoc-Glu-OtBu (ácido (4S)-

5-tert-butoxi-4-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico), si gE está presente en el grupo Z del péptido de la invención, realizando un único acoplamiento con 3 eq de aminoácido durante 18 h con 3 eq. de DIC y 3 eq. de HOAt controlando las reacciones con la prueba de Kaiser.

A continuación, la resina se trató con piperidina al 20% v/v en DMF para eliminar el grupo protector Fmoc (2 x 30 min) y se lavó 3 veces con DMF. Los pasos de eliminación de Fmoc y acoplamiento con Fmoc-Glu-OtBu se repitieron y veces (y = 1 - 5).

A continuación, se lipidó la cadena lateral utilizando 3 eq de ácido láurico Ck (C₁₂), ácido mirístico (C₁₄), ácido pentadecanoico (C₁₅), ácido palmítico (C₁₆), ácido heptadecanoico (C₁₇), ácido esteárico (C₁₈), ácido eicosanoico (C₂₀) o ácido docosanoico (C₂₂) utilizando 3 eq. de DIC y 3 eq. de HOAt en NMP, utilizando los cloruros de acilo correspondientes y DIEA como base en diclorometano o utilizando los correspondientes ésteres N-succinimidílicos y DIEA como base en DMF.

La reacción se controló con la prueba de Kaiser y se dejó proseguir durante toda la noche.

A continuación, la resina que contenía el péptido totalmente protegido se lavó con DCM/DMF/DCM, 3 veces con cada uno, y se secó al vacío.

25 1.B. Escisión del péptido-resina

Al finalizar la síntesis en fase sólida, el péptido se escindió del soporte sólido mediante tratamiento con el reactivo de escisión B: TFA/fenol/H₂O/TIPS (87.5%/5%/5%/2.5%/25ml) durante 3h. (TIPS significa triisopropilsilano).

En ciertos casos, la adición de un ditiol tal como 1,2-etanoditiol o DODT (2,2'-(etilendioxi)dietanotiol) puede representar una ventaja (por ejemplo, reactivo de escisión

K). La solución con TFA que contenía el péptido se filtró y se concentró a presión reducida a $T < 30^{\circ}\text{C}$.

El producto deseado se hizo precipitar con MTBE (éter tert-butil metílico) o éter dietílico enfriados con hielo y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min. El sedimento centrifugado se lavó a continuación con éter dietílico enfriado con hielo y se centrifugó. Este proceso se repitió tres veces.

En algunos casos, puede ser necesario procesar el péptido crudo para eliminar subproductos no deseados tales como ésteres de TFA, aducto de CO_2 en el nitrógeno indólico del triptófano (ácido carbámico) y aducto de 2-t-butilsulfaniletilo en residuos de metionina.

Para eliminar el aducto de CO_2 en el nitrógeno indólico del triptófano, al péptido crudo se añadieron 5 mg/ml de agua que contenía un 10-20% de CH_3CN y se liofilizó.

Para eliminar el aducto de 2-t-butilsulfaniletilo en Met, se disolvió el péptido crudo (2 mg/ml) en una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v) que contenía un 0.1% de ácido fórmico.

La mezcla se agitó suavemente a 37°C durante toda la noche.

Para eliminar los ésteres de TFA, se disolvió el péptido crudo (2 mg/ml) en una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v) que contenía un 0.1% de ácido fórmico. La mezcla se agitó suavemente a 37° durante 1-4 h.

En ambos casos, la solución del péptido crudo obtenida de esta manera se concentró parcialmente a presión reducida y a $T < 30^{\circ}\text{C}$, y se liofilizó.

30 1.C. Paso de purificación

Después de cualquiera de los métodos indicados anteriormente para sintetizar un péptido de la invención, dicho péptido se purificó antes de utilizarlo.

Se disolvieron 80 mg del péptido en 1.5 mL de DMSO y se purificaron mediante cromatografía líquida a presión elevada en fase inversa (RP-HPLC). La RP-HPLC se describió a continuación este documento.

5 Se utilizaron un manipulador de líquidos GX271, bombas 333/334 y un sistema UV/VIS 151 de Gilson.

Se utilizaron dos sistemas diferentes con el fin de purificar dichos péptidos:

Sistema A

- 10 - Columna Delta-Pack C4, 15 μ m, 300Å de Waters. 250x20 mm;
- Solución A: 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en H₂O;
- Solución B: 0.1% de TFA en acetonitrilo;
- 15 - Gradiente: 15% de B durante 5 min; de un 15% de B a un 50% de B en 20 min;
- Tasa de flujo: 80 ml/min.

Sistema B

- Columna CSH C18, 5 μ m, 250x50 mm de Waters, o Sunfire
- 20 C18, 10 μ M, 250x50 mm de Waters;
- Solución A = 0.1% de TFA en agua;
- Solución B = 0.1% de TFA en acetonitrilo;
- Gradiente: de un 1% de B a un 18% de B en 5 min; de un 18% de B a un 28% de B en 10 min; 28% de B durante 15
- 25 min; de un 28% de B a un 48% de B en 10 min; a continuación se lavó la columna desde un 48% de B hasta un 90% de B en 10 min;
- Tasa de flujo: 150 ml/min.

El péptido de interés se eluyó en un margen de tiempo
30 de 35-40 min.

El gradiente se ajustó ligeramente de acuerdo con la polaridad de cada péptido según se caracterizó por su tiempo de retención en un sistema de UHPLC analítico.

Las fracciones que contenían el péptido puro se concentraron a continuación parcialmente a presión reducida a $T < 35^{\circ}\text{C}$ y se liofilizaron hasta alcanzar un peso constante.

Para ciertos usos (por ejemplo, pruebas *in vivo*),
5 resultó conveniente intercambiar la sal de TFA por la sal de acetato. Se utilizaron tres métodos correspondientes y estos se describen en la siguiente parte 1.D.

1.D. Intercambio de acetato

10 **(i) Intercambio de acetato con TOYOPEARL® DEAE 650 C (Tosoh Corporation)**

El intercambio iónico se realizó utilizando una resina TOYOPEARL® DEAE 650 de grado C (una resina de intercambio aniónico débil).

Se lavaron 120 ml de resina secuencialmente con 15
15 volúmenes de NaOH 1 M, 5 volúmenes de H_2O , 5 volúmenes de ácido acético 1.6 M, 5 volúmenes de ácido acético 0.16 M y finalmente 5 volúmenes de H_2O .

A continuación, se disolvieron 41.8 mg del péptido en 4 ml de agua destilada, se depositaron sobre la resina y se
20 mezcló con suavidad durante 2 h.

Finalmente, se recogió el péptido por elución, y se lavó con agua y se liofilizó.

Recuperación del péptido: 35 mg (como sal de acetato mediante F19 RMN (400 MHz) ns 1028).

25 **(ii) Intercambio de acetato con una columna Sepharose HiTrap Q HP (columna de intercambio aniónico fuerte)**

En este segundo método, el intercambio iónico se realizó utilizando una HiTrap Q HP.

La columna (volumen del lecho de 5 ml) se conectó a una
30 bomba peristáltica fijada a 48 (4.5 ml/min) y antes de cargar el péptido, se lavó con 50 ml (10 volúmenes de columna) de H_2O , 100 ml (20 volúmenes de columna) de una solución 1 M de acetato de sodio, 150 ml (30 volúmenes de columna) de H_2O y

con 50 ml (10 volúmenes de columna) de una solución 0.16 M de ácido acético.

El péptido puro se disolvió en 2 mg/ml de una solución 0.16 M de ácido acético, se cargó lentamente en la columna
5 y se eluyó con 4.5 ml/min.

La solución recogida se liofilizó.

La eficacia del intercambio iónico se confirmó mediante F19 RMN (400 MHz) ns 1028.

**(iii) Intercambio de acetato con una resina de
10 intercambio aniónico AG1X4® de BIO RAD**

En un reactor de 125 ml equipado con un filtro de vidrio sinterizado en el fondo se introdujeron 6.2 g de resina de intercambio aniónico AG1X4® de BIO RAD, tamaño de malla seco de 100-200 (forma OH-).

15 La resina se agitó con 3 x 100 ml de ácido acético acuoso 1.6 M (10% v/v) y con 3 x 50 ml de ácido acético acuoso 0.16 M (1% v/v) en un agitador magnético durante 20 min cada uno.

El péptido purificado como la sal de TFA (100 mg) se
20 disolvió en 50 ml de agua destilada, y se vertió sobre la resina de intercambio y se agitó en un agitador magnético durante 120 min.

La solución acuosa se drenó en un matraz de fondo redondo de 100 ml y la resina se lavó con 2x15 ml de ácido
25 acético acuoso 0.16 M (1% v/v).

Las soluciones combinadas que contenían el péptido como la sal de acetato se liofilizaron hasta alcanzar un peso constante. Rendimiento = 80 mg de péptido como la sal de acetato.

30 La eficacia del intercambio iónico se confirmó mediante F19 RMN (400 MHz, ns 1028) y/o cromatografía iónica.

Ejemplo 2: Síntesis ilustrativa de péptidos específicos de la invención

2.A Carga de Fmoc-Lys(Ac)-OH sobre la resina con la amida de Rink

En un reactor de 100 ml equipado con un filtro de vidrio sinterizado en el fondo, se hincharon 6 g de resina AM con la amida de Rink de Novabiochem o ChemImpex (carga baja de 0.47 mmol/g) en 40 ml de DMF. Se drenó el disolvente y se añadieron 30 ml de solución de piperidina al 20% en DMF. Tras agitar durante 15 min, se drenó el disolvente. Esto se repitió dos veces para garantizar la eliminación total del grupo protector Fmoc. La resina se lavó con 5 x 30 ml de DMF.

En un matraz separado se preparó una solución que contenía Fmoc-Lys(Ac)-OH (3.5 g , 8 mmol, 3 eq.) HOBT.H₂O (1.3 g, 8.5 mmol) en 30 ml de DMF. Se añadió diisopropilcarbodiimida (DIC) (1 g, 8.5 mmol) a esta solución y después de 5 min se añadió la mezcla resultante a la resina. La suspensión se agitó en un agitador magnético durante 4 h o hasta el final de la reacción según se estimó mediante la Prueba de Kaiser (prueba de la ninhidrina) sobre una parte alícuota de la resina.

A continuación se drenó el disolvente y la resina se lavó 3 veces con 30 ml de DMF. Se utilizó la resina cargada con Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ inmediatamente para pasos subsiguientes o se almacenó húmeda a 4 °C hasta que se necesitó.

25 2.B. Síntesis del péptido que tiene la SEQ ID NO: 3

La siguiente síntesis se realizó a cabo utilizando 5 veces la cantidad de resina obtenida en el paso 2.A. correspondiente a 0.2 mmol de Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ cada una. Las síntesis se realizaron por separado en cada lote individual utilizando un sintetizador de péptidos por microondas Liberty Blue de CEM para ensamblar el segundo y tercer residuo de la secuencia peptídica (partiendo del extremo C).

La síntesis peptídica se realizó utilizando DIC 0.5

M/Oxyma 1 M en DMF.

Todos los aminoácidos se introdujeron con acoplamientos dobles utilizando el protocolo de calentamiento estándar.

La resina se retiró del sintetizador y se acopló Fmoc-
5 α -metillisina(Boc)-OH (3 eq.) manualmente utilizando 3 eq.
de Oxyma™ y 3 eq. de DIC con calentamiento por microondas
(15 s a 75 °C y 110 s a 90 °C). El final de la reacción se
controló mediante la prueba de Kaiser. Si era positiva, se
añadieron 3 eq. de DIC seguidos de calentamiento por
10 microondas al igual que antes.

Una vez finalizado el acoplamiento de Fmoc- α -
metillisina(Boc)-OH, el resto de la secuencia peptídica se
ensambló utilizando un sintetizador de péptidos por
microondas Liberty Blue de CEM.

15 Todos los aminoácidos se introdujeron con acoplamientos
dobles a 90 °C al igual que antes, con la excepción del ácido
aminoisobutírico en la posición 21 y la serina en la posición
29 para los cuales se realizó un acoplamiento triple a 90°
durante 2 minutos. Se utilizó Fmoc-Lys(Dde)-OH en la posición
20 25.

Al final de las 5 síntesis, los 5 lotes de resina se
combinaron y se transfirieron a una jeringa de polipropileno
de 50 mL, y el péptido se acetiló en el extremo N con
anhídrido acético (944 μ L, 10 mmol) en DMF (30 mL) durante
25 20 minutos, repitiendo el ciclo dos veces.

A continuación, se eliminó el grupo protector Dde en la
cadena lateral de la lisina 25 mediante percolación de 50 mL
de una solución de hidrazina al 5% p/v en DMF, seguida por
lavados con DMF (5x20 ml). La reacción se controló con la
30 Prueba de Kaiser y escisión de una parte alícuota de la
resina y análisis por UPLC/MS.

Se introdujeron tres unidades de espaciador de TTDS
mediante un único acoplamiento realizando tres veces el

siguiente procedimiento: Se añadió a la resina una solución de Fmoc-TTDS-OH (1.62 g, 3 mmol) en 30 ml de DMF, seguida de HOAt (5 ml de una solución de 0.6 ml en DMF, 3 mmol) y DIC (1 ml, 6 mmol). La jeringa se agitó en una mesa orbital
5 durante 18 h. La reacción se controló con la Prueba de Kaiser. La resina se lavó con DMF (2x30 mL). A continuación, se añadieron a la resina 30 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda
10 vez y la resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL).

Se introdujeron tres espaciadores de ácidos gamma-glutámicos realizando un acoplamiento doble de cada Fmoc-Glu-OtBu. Así pues, se aplicó tres veces el siguiente
15 procedimiento:

Se añadió a la resina una solución de ácido (4S)-5-tert-butoxi-4-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico (Fmoc-Glu-OtBu) (1.275 g, 3 mmol) en 30 mL de DMF, seguida de HOAt (5 ml de una solución de 0.6 ml en DMF,
20 3 mmol) y DIC (1 ml, 6 mmol). La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 4 h. La resina se lavó con DMF (2x20 mL) y el acoplamiento se repitió una segunda vez. La reacción se controló con la Prueba de Kaiser. La resina se lavó con DMF (2x30 mL). A continuación, se añadieron a la resina 30
25 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se lavó con DMF (3x30 mL) y diclorometano (3x30 mL).

Finalmente, el péptido se aciló con ácido palmítico
30 (768 mg, 3 mmol), HOAt (5 ml de una solución 0.6 M en DMF, 3 mmol) y activación con DIC (1 ml, 6 mmol) en DMF (30 mL) durante 2.5 h. La resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL) y se secó al vacío.

La escisión del péptido de la resina se realizó utilizando una solución de fenol (6.25 g), agua (6.25 mL) y TIPS (3 mL) en TFA (QSP 125 mL) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración y
 5 se lavó con 2x 30 mL de TFA. Los filtrados combinados se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se concentraron parcialmente al vacío a $T < 30^{\circ}\text{C}$, y el péptido se hizo precipitar mediante la adición de 100 mL de MTBE enfriado con hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 30
 10 minutos.

El sedimento centrifugado se lavó a continuación con éter dietílico enfriado con hielo y se centrifugó. Este proceso se repitió tres veces. Se obtuvieron 4.3 g del péptido crudo. El péptido crudo se disolvió (10 mg/mL) en
 15 una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50:50 v/v) que contenía un 0.1% de ácido fórmico y la mezcla se agitó suavemente a 37° durante 1 h, se concentró parcialmente y se liofilizó.

La purificación se realizó utilizando el sistema de purificación A en 10 inyecciones de 350 mg cada una y las
 20 fracciones que contenían el péptido deseado puro se liofilizaron. El péptido como la sal de trifluoroacetato se obtuvo como un sólido blanco.

$m = 428 \text{ mg}$ (17.5%)

UPLC/MS :

25 TR: 4.98 min. (Condición analítica A), pureza de un 99% (UV)

Masa observada m/z (tipo iónico): 1454.5 (M+3H) ;
 1091.1 (M+4H) ; 873.1 (M+5H).

2.C. Síntesis del péptido que tiene la SEQ ID NO: 7

30 Se procesaron 2 lotes de resina obtenida en 2.A. correspondientes a 0.2 mmol de Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ cada uno (0.4 mmol en total) en paralelo siguiendo el mismo procedimiento que para el ejemplo 2.B. Tras acoplar el tercer

ácido (4S)-5-tert-butoxi-4-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico (Fmoc-Glu-OtBu), los lotes de resina combinados con un peso de 2.6 g se transfirieron a una jeringa de polipropileno de 50 mL.

5 A continuación, se añadieron a la resina 30 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se lavó con DMF (3x30 mL) y diclorometano (3x30 mL).

10 El péptido se aciló mediante la adición de una solución de cloruro de estearoílo (362 mg, 1.2 mmol) y DIPEA (0.255 ml, 1.5 mmol) en 20 ml de DCM durante 2.5 h. La resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL) y se secó al vacío.

15 La escisión del péptido de la resina se realizó utilizando una solución de fenol (1.5 g), agua (1.5 mL) y TIPS (0.6 mL) en TFA (CSP 30 mL) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración y se lavó con 2 x 10 mL de TFA. Los filtrados combinados se
20 transfirieron a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se concentraron parcialmente al vacío a $T < 30^{\circ}\text{C}$, el péptido se hizo precipitar mediante la adición de 100 mL de MTBE enfriado con hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 30 minutos.

25 El sedimento centrifugado se lavó a continuación con éter dietílico enfriado con hielo y se centrifugó. Este proceso se repitió tres veces. Se obtuvieron 720 mg del péptido crudo. La purificación se realizó utilizando el sistema de purificación B en 3 inyecciones de 240 mg cada
30 una. Las fracciones que contenían el péptido deseado puro se liofilizaron. El péptido como la sal de trifluoroacetato se obtuvo como un sólido blanco.

$$m = 72 \text{ mg (3.6 \%)}$$

UPLC/MS :

TR: 5.86 min. (Condición analítica A), pureza de un 98% (UV)

Masa observada m/z (tipo iónico): 1463.9 (M+3H) ;
5 1098.2 (M+4H) ; 878.7 (M+5H).

2.D. Síntesis del péptido que tiene la SEQ ID NO: 6

Se introdujo un lote de resina obtenida en 2.A. Correspondiente a 0.1 mmol de Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ en el reactor de un sintetizador de péptidos por microondas Liberty Blue
10 de CEM. La síntesis peptídica se realizó utilizando DIC 0.5 M/Oxyma 1 M en DMF.

Todos los aminoácidos se introdujeron con acoplamientos dobles a 90 °C al igual que antes, con la excepción del ácido aminoisobutírico en la posición 21 y la serina en la posición
15 29 para los cuales se realizó un acoplamiento triple a 90° durante 2 minutos. Se utilizó Fmoc-Lys(ivDde)-OH en la posición 25.

Al final del ensamblaje del péptido, la resina se transfirió a una jeringa de polipropileno de 20 ml y el
20 péptido se acetiló en el extremo N con anhídrido acético (95 µL, 1 mmol) y DIPEA (174 µL, 1 mmol) en DMF (10 mL) durante 20 minutos, repitiendo el ciclo dos veces.

A continuación, se eliminó el grupo protector ivDde en la cadena lateral de la lisina 25 mediante agitación con 10
25 mL de una solución de hidrazina al 5% p/v en DMF durante 20 min, tantas veces como fuera necesario hasta que no se pudo detectar material de partida después de la escisión de una parte alícuota de resina y el análisis por UPLC/MS. Cuando se estimó que la desprotección era total, la resina se lavó
30 con DMF (5x10 ml).

Se introdujeron dos unidades de espaciador de TTDS mediante un único acoplamiento realizando dos veces el siguiente procedimiento: Se añadió a la resina una solución

de Fmoc-TTDS-OH (163 mg, 0.3 mmol), HOAt (42 mg, 0.3 mmol) y DIC (77 μ L, 0.5 mmol) 7 mL de DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 18 h. La reacción se controló con la Prueba de Kaiser. Cuando fue necesario, se realizó un
5 acoplamiento doble. La resina se lavó con DMF (2x10 mL). A continuación, se añadieron a la resina 10 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se lavó con DMF (2x10
10 mL) y diclorometano (3x10 mL).

Se introdujeron tres espaciadores de ácidos gamma-glutámicos realizando un acoplamiento doble de cada Fmoc-Glu-OtBu. Así pues, se aplicó tres veces el siguiente procedimiento:

15 Se añadió a la resina una solución de ácido (4S)-5-tert-butoxi-4-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico (Fmoc-Glu-OtBu) (127 mg, 0.3 mmol), HOAt (42 mg, 0.3 mmol) y DIC (77 μ L, 0.5 mmol) en 7 mL de DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 18 h. La
20 reacción se controló con la Prueba de Kaiser. La resina se lavó con DMF (2x10 mL). A continuación, se añadieron a la resina 10 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se
25 lavó con DMF (3x10 mL) y diclorometano (3x30 mL).

Por último, el péptido se aciló con cloruro de estearoílo (62 mg, 0.2 mmol) y DIPEA (54 μ L, 0.3 mmol) en 5 ml de DCM durante 2.5 h. La resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL) y se secó al vacío.

30 La escisión del péptido de la resina se realizó utilizando una solución de fenol (0.5 g), agua (0.5 mL) y TIPS (0.2 mL) en TFA (CSP 10 mL) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración y

se lavó con 2 x 4 mL de TFA. Los filtrados combinados se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 100 mL y se concentraron parcialmente al vacío a $T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el péptido se hizo precipitar mediante la adición de 50 mL de MTBE
 5 enfriado con hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 30 minutos.

El sedimento centrifugado se lavó a continuación con éter dietílico enfriado con hielo y se centrifugó. Este proceso se repitió tres veces. Se obtuvieron 240 g del
 10 péptido crudo. La purificación se realizó utilizando el sistema de purificación B y las fracciones que contenían el péptido deseado puro se liofilizaron. El péptido como la sal de trifluoroacetato se obtuvo como un sólido blanco.

m = 38 mg (8 %)

15 UPLC/MS :

TR: 5.40 min. (Condición analítica A), pureza de un 97% (UV)

Masa observada m/z (tipo iónico): 1376.1 (M+3H) ; 1032.0 (M+4H) ; 826.0 (M+5H).

20 2.E. Síntesis del péptido que tiene la SEQ ID NO: 20

Este compuesto se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado en el ejemplo 2.D salvo que los tres TTDS se introdujeron en la cadena lateral de la lisina 25.

25 De este modo, a partir de 250 mg de la resina obtenida en 2.A. correspondientes a 0.1 mmol de Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ se obtuvo un sólido blanco.

m = 20 mg (4.5%)

UPLC/MS :

30 TR: 5.44 min. (Condición analítica A), pureza de un 99% (UV)

Masa observada m/z (tipo iónico): 2215.0 (M+2H) ; 1476.8 (M+3H) ; 1107.9 (M+4H) ; 886.7 (M+5H).

2.F. Síntesis del péptido que tiene la SEQ ID NO: 22

Este compuesto se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado en el ejemplo 2.B. salvo que se utilizó Fmoc-Lys(Aloc)-OH en la posición 25 (X₂₅) en lugar
5 de Fmoc-Lys(Dde)-OH.

De este modo, se procesaron 250 mg de la resina obtenida en 2.A. correspondientes a 0.1 mmol de Fmoc-Lys(Ac)-NH₂ como en 2.B. hasta el paso de acetilación aminoterminal.

El grupo Aloc en la cadena lateral de Lys₂₅ se eliminó
10 mediante la adición a la resina, en atmósfera de argón, de una solución de 1 ml (8.33 mmol) de fenilsilano en 2 ml de DCM desgasificado y una solución de 10 mg (25.96 µmoles) de tetrakis-(trifenilfosfina)paladio en 4 ml de DCM. La resina se agitó en una mesa orbital durante 60 min, y el medio de
15 reacción se reemplazó con reactivos recién preparados dos veces y se agitó 60 min cada vez.

Cuando la reacción hubo finalizado, la resina se lavó con diclorometano, DIEA al 1% en DMF, dietilditiotiocarbamato al 5% en DMF, DMF, DIEA al 10% en DMF, DMF y diclorometano
20 (3 veces cada uno).

Se introdujeron tres unidades de espaciador de PEG₂DGA mediante un único acoplamiento realizando tres veces el siguiente procedimiento: Se añadió a la resina una solución de Fmoc-PEG₂DGA-OH (170 mg, 0.3 mmol) en 8 mL de DCM, seguida
25 de HOAt (0.5 ml de una solución de 0.6 ml en DMF, 0.3 mmol) y DIC (100 µl, 0.642 mmol). La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 18 h. La reacción se controló con la Prueba de Kaiser. La resina se lavó con DMF (2x10 mL). A continuación, se añadieron a la resina 10 mL de piperidina
30 al 20% v/v en DMF. La jeringa se agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL).

Se introdujeron tres espaciadores de ácidos gamma-glutámicos realizando un acoplamiento doble de cada Fmoc-Glu-OtBu. Así pues, se aplicó tres veces el siguiente procedimiento:

5 Se añadió a la resina una solución de ácido (4S)-5-tert-butoxi-4-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-5-oxopentanoico (Fmoc-Glu-OtBu) (0.13 g, 0.3 mmol) en 8 mL de DMF, seguida de HOAt (0.5 ml de una solución de 0.6 ml en DMF, 0.3 mmol) y DIC (0.1 ml, 0.6 mmol). La jeringa se agitó
10 en una mesa orbital durante 4 h. La resina se lavó con DMF (2x20 mL) y el acoplamiento se repitió una segunda vez. La reacción se controló con la Prueba de Kaiser. La resina se lavó con DMF (2x10 mL). A continuación, se añadieron a la resina 10 mL de piperidina al 20% v/v en DMF. La jeringa se
15 agitó en una mesa orbital durante 20 min. Este procedimiento de desprotección se repitió una segunda vez y la resina se lavó con DMF (3x30 mL) y diclorometano (3x30 mL).

Finalmente, el péptido se aciló con ácido palmítico (80 mg, 0.3 mmol), HOAt (0.5 ml de una solución 0.6 M en DMF, 3
20 mmol) y activación con DIC (0.1 mg, 6 mmol) en DMF (10 mL) durante 2.5 h. La resina se lavó con DMF (2x30 mL) y diclorometano (3x30 mL), y se secó al vacío.

La escisión del péptido de la resina se realizó utilizando una solución de fenol (0.5 g), agua (0.5 mL) y
25 TIPS (0.25 mL) en TFA (CSP 10 mL) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración y se lavó con 2x 5 mL de TFA. Los filtrados combinados se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se concentraron parcialmente al vacío a $T < 30^{\circ}\text{C}$, y el péptido
30 se hizo precipitar mediante la adición de 100 mL de MTBE enfriado con hielo y se centrifugó a 3600 rpm durante 30 minutos.

El sedimento centrifugado se lavó a continuación con

éter dietílico enfriado con hielo y se centrifugó. Este proceso se repitió tres veces. Se obtuvieron 220 mg del péptido crudo.

La purificación se realizó utilizando el sistema de purificación B. Las fracciones que contenían el péptido deseado puro se liofilizaron. El péptido como la sal de trifluoroacetato se obtuvo como un sólido blanco.

m = 37 mg (8 %)

UPLC/MS :

10 TR: 4.99 min. (Condición analítica A), pureza de un 99% (UV)

Masa observada m/z (tipo iónico): 2205.2 (M+2H) ; 1470.5 (M+3H) ; 1103.1 (M+4H) ; 882.7 (M+5H).

2.G. Resultados

15 Los resultados obtenidos con los péptidos de la invención de las SEQ ID NO: 1-32, 34-37, 39, 44, 45, 47-49, 51 y 54-97 se indicaron en la siguiente Tabla 1.

SEQ ID NO	Tiempo ret. en UPLC en min. (Condiciones)	Masa observada				Masa monoisotópica
		Tipo iónico				
		M+5H	M+4H	M+3H	M+2H	
1	3.81 (C)	881.3	1101.3	1467.7		4397.54
2	3.85 (C)	861.9	1077.2	1436.3		4301.47
3	4.98 (A)	873.1	1091.1	1454.5	2181.5	4358.53
4	5.02 (A)	820.5	1025.3	1366.7	2049.4	4095.36
5	4.82 (A)	815.7	1019.3	1358.8	2037.3	4071.28
6	5.40 (A)	826.0	1032.0	1376.1	2063.8	4123.39
7	5.86 (A)	878.7	1098.2	1463.9		4386.56
8	4.83 (A)	807.8	1009.5	1345.7	2018.3	4032.27
9	4.97 (A)	786.9	983.3	1310.7	1965.7	3927.30
10	4.90 (A)	838.5	1047.8	1396.8	2094.8	4185.39
11	5.03 (A)	880.9	1100.9	1467.5	2200.9	4397.54
12	4.98 (A)	870.5	1087.9	1450.2	2174.9	4345.5
13	4.99 (A)	870.3	1087.6	1449.8	2174.7	4344.5
14	4.96 (A)	870.3	1087.6	1449.8		4344.5
15	5.00 (A)	869.9	1087.1	1449.2	2173.3	4342.5
16	4.92 (A)	809.9	1012.1	1349.1	2023.2	4042.33
17	5.00 (A)	817.6	1021.8	1362.1	2042.6	4081.34
18	4.73 (A)	829.3	1036.1	1381.2		4138.40
19	4.88 (A)	786.6	983.0	1310.0	1965.3	3926.21
20	5.44 (A)	886.7	1107.9	1476.8	2215.0	4425.57
21	5.27 (A)	821.4	1026.3	1369.1	2051.6	4099.31
22	4.99 (A)	882.7	1103.1	1470.5	2205.2	4406.5
23	5.24 (A)	870.1	1087.4	1449.5	2173.8	4343.52
24	5.25 (A)	876.9	1095.1	1460.8	2190.8	4377.50
25	5.17 (A)	873.1	1091.4	1454.5	2181.3	4358.49
26	5.24 (A)	813.4	1016.5	1355.0	2032.1	4060.3
27	4.97 (A)	878.7	1098.1	1463.8	2194.9	4386.54
28	4.97 (A)	875.9	1094.6	1459.1	2188.2	4372.55

29	5.00 (A)	875.9	1094.6	1459.2	2188.3	4372.54
30	5.44 (A)	886.5	1107.9	1476.9		4425.57
31	5.07 (A)	886.5	1107.9	1476.8		4425.5
32	5.42 (A)	888.3	1110.3	1479.8	2219.5	4434.5
34	5.45 (A)	818.2	1022.5	1363.4		4084.4
35	5.03 (A)	877.8	1096.8	1462.4	2192.9	4381.5
36	4.96 (A)	870.1	1087.6	1450.1	2174.3	4344.5
37	5.1 (A)	883.3	1103.6	1471.5	2207.4	4410.5
39	5.20 (A)	890.1	112.8	1483.1	2224.6	4444.52
44	4.80 (A)	877.8	1097.1	1462.8		4383.5
45	4.81 (A)	836.6	1045.7	1393.7	2090.6	4177.3
47	4.85 (A)	864.6	1080.3	1440.4	2160.5	4316.5
48	9.23 (D)	864.6	1080.6	1440.8	2160.2	4316.5
49	9.00 (D)	864.6	1080.6	1440.4	2160.3	4316.5
51	5.38 (A)	912.3	1140.1	1519.8	2279.2	4554.6
54	5.41 (A)	851.8	1064.5	1419.1	2128.2	4252.4
55	5.03 (A)	892.1	1114.8	1486.1		4453.6
56	5.42 (A)	876.1	1094.8	1459.5		4373.5
57	4.90 (A)	880.9	1100.9	1467.1	2201.2	4316.5
58	5.48 (A)	946.8	1183.3	1577.5		4727.7
59	5.44 (A)	972.7	1215.6	1620.5		4856.8
60	5.34 (A)	818.2	1022.5	1363.0	2044.0	4084.4
61	5.41 (A)	878.4	1098.1	1463.7	2195.1	4386.6
62	5.34 (A)	906.6	1133.1	1510.5		4526.6
63	4.98 (A)	886.3	1107.6	1476.5		4424.6
64	4.8 (A)	891.9	1114.6	1485.9		4452.6
65	4.97 (A)	892.2	1115.1	1486.4	2228.7	4454.6
66	4.97 (A)	897.5	1121.7	1495.2		4480.6
67	4.98 (A)	886.3	1107.8	1476.8		4425.5
68	5.05 (A)	880.9	1100.9	1467.5		4397.5
69	5.06 (A)	886.5	1107.8	1476.8		4425.5
70	9.29 (D)	886.5	1107.8	1476.8		4425.6

71	4.84 (A)	860.9	1076.3	1434.4		4298.5
72	7.86 (D)	875.4	1094.1	1458.5	2187.4	4370.5
73	4.87 (A)	866.5	1082.8	1443.4		4325.5
74	5.12 (A)	946.9	1183.4	1577.5		4727.8
75	5.28 (A)	952.4	1190.6	1590.9		4755.7
76	5.28 (A)	884.2	1105.1	1473.1		4414.5
77	5.20 (A)	944.5	1180.7	1573.8		4716.7
78	4.09 (A)	933.5	1166.7	1554.9		4660.7
79	4.66 (A)	878.5	1098.1	1463.5		4385.6
80	4.90 (A)	898.8	1123.5	1497.7		4487.5
81	4.84 (A)	884.5	1105.3	1473.4	2210.1	4415.6
82	4.90 (A)	883.7	1104.4	1472.1		4411.6
83	4.71 (A)	886.5	1107.6	1476.7	2214.4	4424.6
84	5.12 (A)	878.7	1097.9	1463.8	2195.1	4386.6
85	4.98 (A)	894.7	1118.6	1490.8		4467.6
86	5.14 (A)	873.1	1091.1	1454.4	2181.6	4358.5
87	4.81 (A)	875.7	1094.6	1459.1	2187.7	4372.5
88	4.82 (A)	873.1	1090.9	1454.2	2181.3	4358.5
89	4.28 (A)	732.4	878.7	1098.2	1436.9	4386.5
90	4.82 (A)	870.1	1087.3	1449.5	2174.2	4344.5
91	4.89 (A)	887.7	1109.6	1479.2	2218.9	4432.5
92	4.20 (A)	895.7	1119.4	1492.2		4471.5
93	4.83 (A)	878.5	1097.7	1463.9	2194.9	4386.5
94	4.84 (A)	878.2	1097.5	1463.3	2194.5	4384.6
95	4.40 (A)	867.8	1084.2	1445.3	2167.9	4330.5
96	4.24 (A)	859.0	1073.5	1431.3	2146.5	4288.5
97	3.77 (A)	884.9	1105.9	1474.2		4417.5

Tabla 1

La condición A es la siguiente:

- Columna: Acquity Peptide CSH, C18, 130 Å, 2.1x100 mm,
1.7 µm;

5 - Temperatura de la columna: 50 °C; Flujo = 0.6 ml/min;

- Disolvente A: 0.1% de TFA en H₂O;
 - Disolvente B: 0.1% de TFA en CH₃CN;
 - Gradiente: de 0 a 1 min B = 2%, de 1 a 7 min B = de un 2% a un 70%, de 7 a 8 min B = de un 70% a un 100%;
- 5 - Detector de UV: longitud de onda: 220 nm; adquisición de MS: ESI+ de 200 a 3000 uma.

La condición B es la siguiente:

- Columna: Acquity BEH C18, 130 Å, 2.1x50 mm, 1.7 µm
 - Temperatura de la columna: 60°C ; Flujo: 0.6 ml/mn
- 10 - Disolvente A: 0.05% de TFA en H₂O
- Disolvente B: 0.05% de TFA en CH₃CN
- Gradiente: de 0 a 1 min B = 2%, de 1 a 16 min B = de un 2% a un 100%, de 16 a 17 min
- B= 100%;
- 15 Detector de UV: longitud de onda: 220 nm; adquisición de MS: ESI+ de 200 a 3000 uma

La condición C es la siguiente:

- Columna: ACQUITY BEH C4, 130 Å, 2.1x50 mm, 1.7 µm;
 - Temperatura de la columna 45 °C; Tasa de flujo: 0.4
- 20 ml/min;
- Disolvente A: 0.1% de TFA en H₂O;
 - Disolvente B: 0.05% de TFA en CH₃CN
- Gradiente: de 0 a 1 min B = 30%, de 1 a 5 min B = de un 30% a un 50%, de 5 a 6 min
- 25 B= 80%;
- Detector de UV: longitud de onda: 220 nm; adquisición de MS: ESI+ de 200 a 3000 uma

La condición D es la siguiente:

- Columna: Acquity Peptide CSH, C18, 130 Å, 2.1x150 mm,
- 30 1.7 µm;
- Temperatura de la columna: 60 °C; Flujo: 0.4 ml/min;
 - Disolvente A: 0.1% de TFA en H₂O;
 - Disolvente B: 0.05% de TFA en CH₃CN;

- Gradiente: de 0 a 1 min B = 2%, de 1 a 14 min B = de un 2% a un 70%, de 14 a 16 min B = de un 70% a un 100%;

- Detector de UV: longitud de onda: 220 nm; adquisición de MS: ESI+ de 200 a 3000 uma.

5 Los siguientes péptidos de acuerdo con la invención se pueden preparar respectivamente tal como se ha descrito anteriormente: SEQ ID NO 33, 38, 40, 41, 43, 46, 50, 52 y 53.

10 **Ejemplo 3: Análisis *in vitro* de péptidos de la invención en receptores RXFP1 (ensayo de cAMP en OVCAR5)**

A. Método

Se utilizaron células OVCAR5 que expresan RXFP1 endógeno para estudiar las propiedades agonistas respecto a RXFP1 de los péptidos de la invención, y en particular de los
15 péptidos de la secuencia SEQ ID NO: 1-97.

Dados que RXFP1 es un GPCR acoplado a proteínas G, se utilizó cAMP como lectura de la activación de RXFP1.

Se utilizó isobutilmetilxantina (IBMX) para inhibir la actividad de fosfodiesterasa y facilitar las mediciones de
20 cAMP. Se utilizó la tecnología de HTFR (siglas en inglés de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo) para detectar cAMP debido a su gran sensibilidad.

Resumiendo, se cultivaron OVCAR5 en medio habitual (RPMI) que contenía un 10% de suero bovino fetal (FCS, por
25 sus siglas en inglés) y un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Antes los experimentos, se desprendieron las células con accutase y se incubaron durante 40 minutos a 37 °C con IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 1 mM.

30 A continuación, se distribuyeron las células en placas de 384 pocillos negras que contenían concentraciones crecientes de los diferentes péptidos en un volumen fijo de medio (sin FCS).

Después de una incubación de 30 min a 37 °C en una incubadora húmeda con un 5% de CO₂, se detuvo la reacción añadiendo un volumen fijo de una solución que contenía un tampón de lisis y cAMP-D2 (cAMP marcado con el colorante d2) y el anticuerpo anti-cAMP ligado a europio y utilizado para la detección de cAMP.

La lectura del experimento se realizó en un fluorímetro que permitía la medición de HTFR. Se generaron las curvas de activación representando gráficamente el valor intracelular de cAMP frente a log10 de la concentración del compuesto.

Se calculó la concentración para una activación del 50% (CE₅₀) mediante una regresión no lineal utilizando la ecuación dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) con el programa informático Prism 5.

Se determinó el % de Emáx como el valor intracelular máximo de cAMP para el compuesto de prueba (límite superior de la curva de cAMP frente a concentración) dividido por el valor intracelular máximo de cAMP para la relaxina-H2 determinado en el mismo caso de prueba multiplicado por 100.

$$\text{Emáx\%} = 100 \times [\text{cAMP}_{\text{comp de prueba}}] / [\text{cAMP}_{\text{Rlx-H2}}]$$

B. Resultados

Los resultados obtenidos con los péptidos de la invención se representan en la siguiente Tabla 2.

SEQ ID NO	células OVCAR5 (cAMP)	
	CE50 (nM)	EMáx
1	1.50	99%
2	2.40	99%
3	0.34	97%
4	1.50	89%
5	9.10	85%
6	0.27	95%
7	0.07	95%
8	1.86	92%
9	0.70	93%
10	0.79	95%
11	0.83	93%
12	0.93	90%
13	2.12	91%
14	3.20	90%
15	2.10	85%
16	6.80	88%
17	4.60	91%
18	1.54	92%
19	11.5	94%
20	0.15	96%
21	0.65	93%
22	1.00	92%
23	11.1	92%
24	36.4	100%
25	28.7	100%
26	0.43	96%
27	1.80	98%
28	0.62	88%

29	1.60	88%
30	0.21	89%
31	0.19	94%
32	0.10	97%
34	0.14	90%
35	2.33	91%
36	3.60	93%
37	5.60	98%
39	8.70	93%
42	1.50	84%
44	2.2	97%
45	0.45	96%
47	0.64	95%
48	0.45	96%
49	0.19	97%
51	0.10	98%
54	0.16	96%
55	0.18	93%
56	0.15	91%
57	0.44	98%
58	0.08	98%
59	0.09	99%
60	0.15	95%
61	0.10	97%
62	0.60	98%
63	1.45	97%
64	0.52	95%
65	1.19	95%
66	6.31	93%
67	0.48	95%
68	0.88	98%
69	0.78	97%
70	1.34	94%
71	0.36	95%
72	0.56	91%
73	0.20	95%
74	0.54	94%
75	0.19	97%
76	0.18	96%

77	0.11	98%
78	0.18	99%
79	0.45	95%
80	0.63	93%
81	0.16	98%
82	0.54	95%
83	0.25	94%
84	0.10	95%
85	0.30	92%
86	0.30	95%
87	ND	
88	ND	
89	ND	
90	ND	
91	0.09	97%
92	ND	
93	0.77	86%
94	1.74	88%
95	1.80	91%
96	0.88	92%
97	ND	

Tabla 2

Parece que los péptidos de acuerdo con la invención poseen propiedades agonistas respecto a RXP1 muy interesantes y son muy eficaces para unirse a RXFP1 y activarlo.

Todos ellos son además significativa e inesperadamente superiores a los péptidos de la técnica anterior en lo que se refiere a activar el receptor RXFP1.

Se ha realizado el mismo experimento con péptidos de la técnica anterior (documento WO2015/157829) que se conocen con los nombres B7-33 C11.23S, AcB7-33 C11.23S y KKKK(AcB7-29 C11.23S).

Se han obtenido los siguientes resultados de CE₅₀ para estos tres péptidos.

Nombre	Ensayo de cAMP en
--------	-------------------

	células OVCAR 5	
	CE50 (nM)	Emáx
B7-33 C11.23S	1641	90%
AcB7-33 C11.23S	929	70%
KKKK (AcB7-29 C11.23S)	206	84%

Tabla 3

Tal como se ha demostrado anteriormente, los péptidos de acuerdo con la invención poseen propiedades agonistas respecto a RXFP1 muy interesantes y son muy eficaces para activar RXFP1. Todos ellos son además significativa e inesperadamente superiores a los péptidos de la técnica anterior.

Ejemplo 4: Prueba de solubilidad de los péptidos de la invención en tampón

10 A. Método

Antes de la prueba de la solubilidad de un lote de péptido, se determinó su pureza (HPLC-UV).

Medio de estudio:

15 Tampón fosfato 50 mM pH 6.5: 15.9 ml de Na₂HPO₄ 0.1 M (Carlo Erba 480087) + 34.1 ml de NaH₂PO₄ 0.1 M (Carlo Erba 480141) + H₂O MilliQ CSP 100 ml

Tampón fosfato 50 mM pH 7.4: 40.5 ml de Na₂HPO₄ 0.1 M (Carlo Erba 480087) + 9.5 ml de NaH₂PO₄ 0.1 M (Carlo Erba 480141) + H₂O MilliQ CSP 100 ml

20 Tampón acetato 50 mM pH 4.5 : 0.75 g de C₂H₃CO₂Na, 3H₂O (Sigma S7545) + 0.35 ml de una solución al 100% de CH₃CO₂H disuelto en agua Millipore, que se ajusta a pH con CH₃CO₂H diluido (1:1) y se diluye hasta 250 ml con agua Millipore.

25 En un vial Ependorph de 4 ml, se diluyó una muestra pesada con exactitud del compuesto en medio de estudio para

obtener la concentración deseada de 2, 6 o 10 mg/ml de compuesto puro. Los viales con las muestras se agitaron (agitador rotatorio y de balanceo ("rock 'roll shaker")) durante ~19 h. Se filtraron alícuotas de 300 µL a través de una placa "Solvinert" de Millipore (0.45 µm - PTFE hidrófilo). A continuación, se determinó la solubilidad comparando una inyección de 0.2 pL del filtrado con las áreas de los picos de UV obtenidos con una solución patrón del péptido con una concentración de 1.2 mg/ml en DMSO (basada en el % de pureza), e inyectando diversos volúmenes comprendidos entre 0.2 - 2 pL.

Análisis:

Se midió el pH con un microelectrodo

Condiciones de HPLC:

Sistema Acquity UPLC de Waters con detector DAD

Columna: Columna para péptidos CSH C18 (130 Å ; 1.7 µm ; 50*2.1 mm) de Waters

Temperatura de la columna: 60 °C

Flujo: 0.3 ml/min

Bucle completo (aproximadamente 5 µL) - factor de sobrellenado 5

Lavado débil y fuerte: H₂O/ACN (75/25; V/V); Lavado de sellos: H₂O/IsOH (95/5; V/V). Fase móvil:

Disolvente A: 0.05% de TFA en H₂O; Disolvente B: 0.035% de TFA en CH₃CN

Gradiente: de 0 a 12 min B = de un 2% a un 60%, de 12 a 14 min B = de un 60% a un 100%. Lavado de la columna 100% de B 1 min, equilibrado de la columna 2% de B 2.5 min.

Detector UV: longitud de onda: 220 nm.

B. Resultados

Los resultados de la solubilidad obtenidos se representan en la siguiente Tabla 4.

SEQ ID NO	Solubilidad en tampón acetato pH 4.5*	Solubilidad en tampón fosfato pH 7.4*
3	11.1 mg/ml	11.5 mg/ml
4	9.63 mg/ml	7.71 mg/ml
5	6.24 mg/ml	6.41 mg/ml
7	11.45 mg/ml	11.83 mg/ml
13	ND	7.68 mg/ml
16	6.33 mg/ml	6.72 mg/ml
17	9.22 mg/ml	6.81 mg/ml
18	6.75 mg/ml	6.58 mg/ml
20	9.34 mg/ml	9.95 mg/ml
21	6.28 mg/ml	6.59 mg/ml
23	0.55 mg/ml	6.77 mg/ml
24	0.28 mg/ml	6.93 mg/ml
25	6.58 mg/ml	6.75 mg/ml
26	6.68 mg/ml	6.76 mg/ml
44	11.07 mg/ml	10.72 mg/ml
55	9.26 mg/ml	8.84 mg/ml
70	8.24 mg/ml	9.68 mg/ml
71	8.28 mg/ml	8.77 mg/ml
72	8.25 mg/ml	8.72 mg/ml
74	7.39 mg/ml	8.47 mg/ml
75	8.58 mg/ml	9.56 mg/ml

Tabla 4: **Solubilidad deseada: 10.0 mg/ml

Se ha realizado el mismo experimento con péptidos de la

técnica anterior (documento WO2015/157829) que se conocen con los nombres B7-33 C11.23S, AcB7-33 C11.23S y KKK(AcB7-29 C11.23S).

Se han obtenido los siguientes resultados de solubilidad para estos tres péptidos.

Nombre	Solubilidad en tampón acetato pH 4.5**	Solubilidad en tampón fosfato pH 7.4**
B7-33 C11.23S	1.9 mg/ml	0.014 mg /ml
AcB7-33 C11.23S	1.54 mg/ml	<0.001 mg/ml
KKKK (AcB7-29 C11.23S)	2.3 mg/ml	0.177 mg/ml

Tabla 5

****Solubilidad deseada: 2.0 mg/ml**

Los péptidos de la invención presentan una mejor solubilidad en comparación con los compuestos de la técnica anterior. Esta propiedad podría permitir un intervalo mayor de concentración cuando se preparan soluciones inyectables y, de esta manera, expandir los intervalos posológicos *in vivo*.

Ejemplo 5: Prueba de la estabilidad de péptidos en sangre o plasma humano o de rata

A. Método

Antes de la prueba de la estabilidad en plasma (o sangre) de un lote de péptido, se determinó su pureza (HPLC-UV).

Medio de estudio:

Plasma humano y de rata: heparina de litio o sodio anticoagulante.

Sangre humana y de rata: heparina de litio o sodio anticoagulante.

Solución patrón:

Solución 100 μM del compuesto de estudio en tampón fosfato 50 mM pH 7.4.

Se preincubaron 950 μL de plasma (o sangre) durante 5 min a 37 °C. Se añadieron 50 μL de solución patrón del compuesto. Concentración final del compuesto = 5 μM . Agitar en vórtex y transferir 150 μL de plasma (o sangre) a un Eppendorf para cada punto temporal. Los puntos temporales 0 - 1 y - 4 h se llevaron a cabo por duplicado para cada especie.

Después de la incubación, se extrajeron 150 μL de plasma (o sangre) con 600 μL de acetonitrilo que contenía un 1% de TFA. A continuación, dicha mezcla se agitó en vórtex y centrifugó 10 min a 14 600 rpm. Se secaron 200 μL de sobrenadante con N_2 . La muestra se reconstituyó a continuación en 200 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 98/2 + 0.1% de FA + 50 ng/ml de Labetalol y se analizó utilizando el sistema analítico utilizado en los estudios de solubilidad y estabilidad.

Para determinar la cantidad del péptido restante, se compararon las áreas de los picos del compuesto deseado en t_0 y cada uno de los días correspondientes a puntos temporales, lo que dio como resultado el "% de péptido restante", siguiendo la ecuación:

% de péptido restante = [(área del pico del péptido en el tiempo) $\times$ 100]/área del pico del péptido en t_0 . La estabilidad se expresó como "% de péptido restante".

Criterios de aceptación: Los compuestos de prueba se consideraron estables si la precisión era de ~ un 15% y la recuperación estaba comprendida en un intervalo de un 85 - 115%.

B. Resultados

Los resultados de la estabilidad en plasma y sangre

obtenidos se representan en la siguiente Tabla 6.

SEQ ID NO	Estabilidad en plasma humano*			Estabilidad en plasma de rata*		
	% restante			% restante		
	T=0	1h	4h	T=0	1h	4h
3	99	95	100	98	100	87
3*	100*	95*	95*	100*	95*	84*
4	100	100	100	100	100	59
4*	100*	100*	99*	100*	102*	86*
6	97	92	91	97	94	ND
7	92	94	87	77	100	66
13	100	91	89	89	100	ND
20	87	100	83	100	100	ND

Tabla 6: *Estabilidad en sangre

Se ha realizado el mismo experimento con péptidos de la técnica anterior (documento WO2015/157829) que se conocen con los nombres B7-33 C11.23S, AcB7-33 y KKKK(AcB7-29 C11.23S).

Se han obtenido los siguientes resultados de la estabilidad en plasma para estos tres péptidos.

Nombre	Estabilidad en plasma humano			Estabilidad en plasma de rata		
	% restante			% restante		
	T=0	1h	4h	T=0	1h	4h
B7-33 C11.23S	100	18	3	100	15	2
Ac B7-33	100	67	18	100	16	2
KKKK(AcB7-29 C11.23S)	100	41	31	100	23	14

Tabla 7

Los péptidos de la invención parecen ser más estables en plasma y/o sangre que los compuestos de la técnica anterior.

Ejemplo 6: Determinación farmacocinética (PK) de los péptidos después de la administración *in vivo* a ratas.

A. Método:

Antes de la prueba de un lote de péptido, se determinó su pureza (HPLC-UV). La dosis se corrigió para la presencia de sales, disolvente y pureza.

Método de cribado bioanalítico para la cuantificación de péptidos en ratas:

Se administró el péptido de estudio a ratas Sprague Dawley en una dosis de 1 mg/kg por vía intravenosa (i.v.) o 3 mg/kg por vía subcutánea (s.c.) como una solución en PBS (0.2 mg/ml y 0.6 mg/ml, respectivamente).

Se recogieron muestras de sangre después de: 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h (vía i.v.) y 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 h (vía s.c.) después de la aplicación.

Las muestras de plasma se analizaron después de la precipitación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

Se calcularon los parámetros PK y la semivida utilizando Phoenix 64 (WinNonlin 6.4) - Pharsight (CertaraTM) (modelo no compartimental). Los valores por debajo del límite de cuantificación (BLQ, por sus siglas en inglés) fueron reemplazados por cero para los posteriores cálculos y análisis PK.

B. Resultados:

Los parámetros PK obtenidos se representan en la siguiente Tabla 8.

Se utilizan las siguientes abreviaturas:

$T_{1/2}$: semivida *in vivo*, tiempo requerido para que la concentración en plasma del compuesto de prueba se divida por dos durante el experimento PK.

C0: Concentración en plasma del compuesto de prueba

extrapolada al punto temporal $t = 0$ (vía i.v.).

$C_{\text{máx}}$: concentración en plasma máxima del compuesto de prueba en el punto temporal indicado (vía s.c.).

$T_{\text{máx}}$: Punto temporal en el que se alcanzó la $C_{\text{máx}}$.

5 % de F: biodisponibilidad s.c. frente a i.v., área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) corregida para la dosis por vía s.c. dividida por la AUC i.v.

SEQ ID NO	PK en rata, 1 mg/kg i.v.		PK en rata, 3 mg/kg s.c.		
	$T_{1/2}$ (h)	C_0 (μM)	$C_{\text{máx}}$ (μM)	$T_{\text{máx}}$ (h)	% de F
3	7.8	3.2	2.3	8	83
4	8.71	2.75	1.99	8	69
6	5.59	5.17	2.71	8	72
7	6.34	4.16	1.53	10	61
20	5.13	3.09	1.99	10	80
55	4.89	4.91	2.07	6	65

Tabla 8

10 Se ha realizado el mismo experimento con la Relaxina-H2.

Compuesto	PK en rata, 1 mg/kg i.v.	
	$T_{1/2}$ (h)	C_0 (μM)
Relaxina-H2	0.46	0.87

Tabla 9

15 En comparación con la relaxina-H2, los péptidos de la invención seleccionados presentan unos parámetros farmacocinéticos mejorados. En particular, su semivida *in*

vivo en ratas varía de 4 h a 9 h. Tales péptidos podrían entonces conservar su eficacia durante un periodo de tiempo más prolongado, lo cual permitiría una administración una vez al día por vía intravenosa o subcutánea.

Listado de secuenciasSEQ ID NO: 1

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 2

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Aib-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 3

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 4

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 5

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂-PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 6

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 7

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 8

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂-PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 9

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 10

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-gE-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 11

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-

TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 12

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-Cit-I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 13

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-K-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 14

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-Dser-K-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 15

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-Aib-K-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 16

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Dlys-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 17

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Dlys-R-A-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 18

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Dlys-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 19

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂-PEG₂-
PEG₂-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 20

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 21

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂-PEG₂-
PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Estea) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 22

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂DGA-

PEG₂DGA-PEG₂DGA-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 23

Ac-L-E-G-R-E-L-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 24

Ac-L-E-G-R-E-F-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 25

10 Ac-L-E-G-R-E-Q-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 26

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂-PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 27

15 Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 28

Ac-L-E-G-R-E-Hly-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 29

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-Aib-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 30

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-W-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 31

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 32

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (PEG₂DGA-PEG₂DGA-PEG₂DGA-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 33

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-

gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 34

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

5 SEQ ID NO: 35

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-Aib-K-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 36

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Dlys-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 37

Ac-L-E-G-R-E-L-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-S-Aib-R-R-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 38

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 39

Ac-L-E-G-R-E-F-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-S-Aib-R-R-K(Ac)-NH₂

20 SEQ ID NO: 40

Ac-L-E-G-R-E-Q-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-S-Aib-R-R-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 41

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂DGA-PEG₂DGA-PEG₂DGA-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 42

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂-PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 43

30 Ac-L-E-G-R-E-Hly-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 44

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-

TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-W-Dser-K-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 45

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂-PEG₂-
PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

5 SEQ ID NO: 46

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂-PEG₂-
PEG₂-PEG₂-PEG₂-gE-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 47

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 48

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-Q-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 49

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm)-S-T-F-S-Mly-R-A-K-NH₂

SEQ ID NO: 50

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂DGA-
PEG₂DGA-PEG₂DGA-gE-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Aib-R-K-K(Ac)-NH₂

20 SEQ ID NO: 51

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Aib-R-K-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 52

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Aib-R-K-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 53

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(PEG₂DGA-
PEG₂DGA-PEG₂DGA-gE-gE-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Aib-R-K-K(Ac)-NH₂

SEQ ID NO: 54

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-gE-Estea)-S-T-W-S-Aib-R-K-K(Ac)-NH₂

SEQ-ID-NO: 55

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K(Ac)-I-Aib-Aib-E-G-K(TTDS-TTDS-

TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 56

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-Cit-I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 57

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Hly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 58

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 59

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 60

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 61

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Estea) -S-T-F-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 62

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 63

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-Q-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 64

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-R-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 65

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-K (Ac) -Q-I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-
TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 66

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-

TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-K (Ac) -Aib-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 67

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 68

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K (Ac) -K-NH₂

SEQ ID NO: 69

10 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K (Ac) -R-NH₂

SEQ ID NO: 70

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-I-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 71

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-A-K-NH₂

SEQ ID NO: 72

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-Aib-R-R-A-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 73

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-K-W-S-Aib-R-A-K-NH₂

SEQ ID NO: 74

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-I-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 75

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 76

30 Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 77

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-

TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 78

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 79

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-K-F-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 80

10 Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-Trp (5-Cl) -S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 81

Ac-K (Ac) -E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 82

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-Aib-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-W-S-Aib-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 83

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-K-W-S-Aib-R-K-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 84

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-I-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 85

25 Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-Aib-K (Ac) I Aib Aib E G K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) S T W S Aib R R K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 86

Ac-Aib-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-I-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 87

30 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-R-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 88

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-

TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Hly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 89

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-Mph-S-R-R-A-K (Ac) -NH₂

5 SEQ ID NO: 90

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-A-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 91

10 Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-Pfp-S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 92

Ac-L-E-G-R-E-R-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-Trp (5-F) -S-Aib-R-R-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 93

15 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-T-R-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 94

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Palm) -S-T-F-V-R-R-A-K (Ac) -NH₂

20 SEQ ID NO: 95

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Myr) -S-T-F-S-Mly-R-A-K (Ac) -NH₂

SEQ ID NO: 96

25 Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Myr) -S-T-F-S-Mly-R-A-K-NH₂

SEQ ID NO: 97

Ac-L-E-G-R-E-K-V-R-A-K (Ac) -I-Aib-Aib-E-G-K (TTDS-TTDS-TTDS-gE-gE-gE-Myr) -S-T-F-S-Mly-R-A-K-NH₂

SEQ ID NO: 100 = Cadena A de la relaxina-H2

30 H-Gln-Leu-Tyr-Ser-Ala-Leu-Ala-Asn-Lys-Cys-Cys-His-Val-Gly-Cys-Thr-Lys-Arg-Ser-Leu-Ala-Arg-Phe-Cys-OH

SEQ ID NO: 101 = Cadena B de la relaxina-H2

H-Asp-Ser-Trp-Met-Glu-Glu-Val-Ile-Lys-Leu-Cys-Gly-Arg-

Glu-Leu-Val-Arg-Ala-Gln-Ile-Ala-Ile-Cys-Gly-Met-Ser-Thr-
Trp-Ser-OH

SEQ ID NO: 102 = SEQ ID B7-33 C11.23S*

H-Val-Ile-Lys-Leu-Ser-Gly-Arg-Glu-Leu-Val-Arg-Ala-Gln-
5 Ile-Ala-Ile-Ser-Gly-Met-Ser-Thr-Trp-Ser-Lys-Arg-Ser-Leu-NH₂

SEQ ID NO: 103 = SEQ ID AcB7-33 C11.23S*

Ac-Val-Ile-Lys-Leu-Ser-Gly-Arg-Glu-Leu-Val-Arg-Ala-
Gln-Ile-Ala-Ile-Ser-Gly-Met-Ser-Thr-Trp-Ser-Lys-Arg-Ser-
Leu-NH₂

10 SEQ ID NO: 104 = SEQ ID KKKK(AcB7-29 C11.23S)*

Ac-Val-Ile-Lys-Leu-Ser-Gly-Arg-Glu-Leu-Val-Arg-Ala-
Gln-Ile-Ala-Ile-Ser-Gly-Met-Ser-Thr-Trp-Ser-Lys-Lys-Lys-
Lys-NH₂

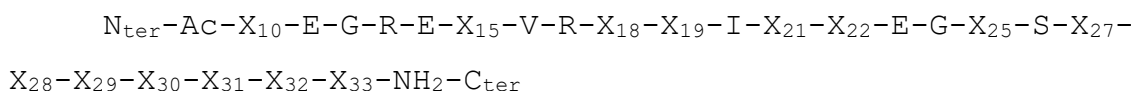
*ejemplos de comparación

15 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
método conocido por la solicitante para llevar a la práctica
la citada invención, es el que resulta claro de la presente
descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5 1. Un péptido que tiene la siguiente fórmula (I):



donde:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

10 C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

Ac representa un grupo acetilo;

X_{10} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por leucina, ácido 2-aminoisobutírico, Nε-acetililisina y α-metilleucina;

15 E representa ácido glutámico;

G representa glicina;

R representa arginina;

X_{15} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, arginina, homolisina, homoarginina, ornitina, glutamina, fenilalanina y leucina;

V representa valina;

X_{18} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina, ácido 2-aminoisobutírico, leucina, Nε-acetililisina y glutamina;

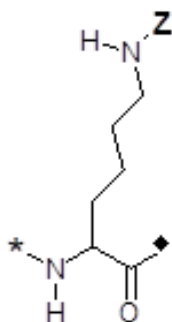
25 X_{19} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, Nε-acetililisina, citrulina, glutamina, alanina y ácido 2-aminoisobutírico;

I representa isoleucina;

30 X_{21} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y alanina;

X_{22} representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico e isoleucina;

X_{25} representa la siguiente estructura:



en la cual:

-* representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (I);

5 - ♦ representa un enlace covalente con la serina que sigue a X₂₅ en la fórmula (I); y

Z representa un grupo de fórmula (II):

-[(PEGxx)_b(gE)_cC_d],

b y c representan independientemente 1, 2, 3, 4 o 5;

10 PEGxx representa independientemente un derivado de polietilenglicol seleccionado a partir del grupo constituido por PEG₂, PEG₂DGA y TTDS;

gE representa ácido gamma-glutámico; y

C_d representa un grupo acilo C₁₂-C₂₂ saturado lineal;

15 S representa serina;

X₂₇ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por treonina, lisina, arginina y glutamina;

20 X₂₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por triptófano, fenilalanina, 5-fluorotriptófano, 5-clorotriptófano, 5-metoxitriptófano, tirosina, 4-fluorofenilalanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, α-metiltryptófano, α-metilfenilalanina y 5-hidroxitriptófano;

25 X₂₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por serina, D-serina, ácido 2-aminoisobutírico, treonina, α-metilserina, Nε-acetil lisina

y valina;

X₃₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico, α-metillisina, D-lisina, lisina, homolisina, ornitina, arginina y α-metilarginina;

X₃₁ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por arginina, Nω-metilarginina, alanina, Nω,Nω'-dimetilarginina y citrulina;

X₃₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, alanina, arginina, Nε-acetillisina y Nε,Nε,Nε-trimetillisina; y

X₃₃ representa un aminoácido seleccionado entre lisina, Nε-acetillisina, leucina, arginina y alanina;

o una sal o solvato de este.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde b representa 2, 3, 4 o 5 y c representa 2, 3 o 4.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde C_d representa un grupo acilo saturado lineal seleccionado a partir del grupo constituido por grupo acilo C₁₂ (Lau), C₁₄ (Myr), C₁₅ (Penta), C₁₆ (Palm), C₁₇ (Hepta), C₁₈ (Estea), C₂₀ (Eico) y C₂₂ (Doco), en particular un grupo acilo saturado lineal seleccionado a partir del grupo constituido por grupo acilo C₁₂ (Lau), C₁₄ (Myr), C₁₅ (Penta), C₁₆ (Palm), C₁₇ (Hepta) o C₁₈ (Estea), y particularmente un grupo acilo C₁₆ o C₁₈ lineal.

4. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene la siguiente fórmula (Ib):

$$\text{N}_{\text{ter}}-\text{Ac}-\text{X}_{10}-\text{E}-\text{G}-\text{R}-\text{E}-\text{X}_{15}-\text{V}-\text{R}-\text{X}_{18}-\text{X}_{19}-\text{I}-\text{X}_{21}-\text{X}_{22}-\text{E}-\text{G}-\text{X}_{25}-\text{S}-\text{X}_{27}-\text{X}_{28}-\text{X}_{29}-\text{X}_{30}-\text{R}-\text{X}_{32}-\text{X}_{33}-\text{NH}_2-\text{C}_{\text{ter}}$$

donde:

N_{ter} representa el extremo aminoterminal del péptido;

C_{ter} representa el extremo carboxiterminal del péptido;

Ac representa un grupo acetilo;

X₁₀ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por leucina, Nε-acetililisina y ácido 2-aminoisobutírico;

E representa ácido glutámico;

5 G representa glicina;

R representa arginina;

X₁₅ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, arginina, homolisina, glutamina, fenilalanina y leucina;

10 V representa valina;

X₁₈ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por alanina, ácido 2-aminoisobutírico y Nε-acetililisina;

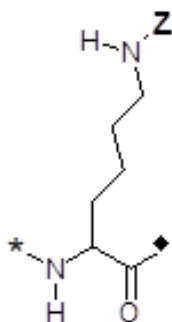
15 X₁₉ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por lisina, Nε-acetililisina, glutamina y citrulina;

I representa isoleucina;

X₂₁ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico y alanina;

20 X₂₂ representa un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico e isoleucina;

X₂₅ representa la siguiente estructura:



en la cual:

25 - * representa un enlace covalente con la glicina que precede a X₂₅ en la fórmula (Ia);

- ♦ representa un enlace covalente con la serina que

sigue a X_{25} en la fórmula (Ia); y

Z se selecciona a partir del grupo constituido por un
 - (TTDS)₂-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Palm, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₃-
 Palm, - (PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₂-(gE)₂-Palm,
 5 - (TTDS)₂-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-(gE)₃-Estea, - (PEG₂DGA)₃-
 (gE)₃-Estea, - (PEG₂DGA)₃-(gE)₄-Estea, - (PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, -
 (PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, - (PEG₂)₅-(gE)₃-Palm, - (PEG₂)₅-(gE)₄-Palm,
 - (TTDS)₃-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₂-(gE)₄-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₂-
 Estea, - (TTDS)₂-(gE)₄-Estea, - (TTDS)₄-(gE)₃-Estea, - (TTDS)₃-
 10 (gE)₄-Palm, - (TTDS)₄-(gE)₃-Palm, - (TTDS)₃-(gE)₃-Myr y -
 (TTDS)₃-(gE)₄-Myr donde

gE representa ácido gamma-glutámico

Palm representa Palmitoílo y

Estea representa Estearoílo;

15 S representa serina;

X_{27} representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por treonina, glutamina, arginina y
 lisina;

X_{28} representa un aminoácido seleccionado a partir del
 20 grupo constituido por triptófano, fenilalanina, 5-
 Clorotriptófano, α -Metilfenilalanina, 4-Fluorofenilalanina
 y 5-Fluorotriptófano;

X_{29} representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por serina, D-serina,
 25 ácido 2-aminoisobutírico, N ϵ -acetillisina, treonina y
 valina;

X_{30} representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por ácido 2-aminoisobutírico, α -
 metillisina, D-lisina, lisina, homolisina y arginina;

30 X_{32} representa un aminoácido seleccionado a partir del
 grupo constituido por lisina, alanina, arginina y N ϵ -
 acetillisina; y

X_{33} representa un aminoácido seleccionado entre lisina,

Nε-acetililisina y arginina;

o una sal o solvato de este.

5. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde este tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de las SEQ ID NO: 1-97.

6. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 de fórmula (Ib), donde Z se selecciona a partir del grupo constituido por un -(TTDS)₂-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₂-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₃-Estea, -(TTDS)₃-(gE)₃-Estea, -(PEG₂DGA)₃-(gE)₃-Estea, -(PEG₂)₃-(gE)₃-Palm, -(PEG₂)₄-(gE)₃-Estea, -(PEG₂)₅-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₃-(gE)₄-Estea, -(TTDS)₂-(gE)₄-Palm, -(TTDS)₂-(gE)₄-Estea, -(TTDS)₄-(gE)₃-Estea, -(TTDS)₃-(gE)₄-Palm, -(TTDS)₄-(gE)₃-Palm, -(TTDS)₃-(gE)₃-Myr y -(TTDS)₃-(gE)₄-Myr.

7. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID NO: 3, 6, 7, 9-12, 20-22, 26, 28, 30-34, 45, 47-49, 51, 54-62, 64, 67-69, 71-86, 91, 93 y 96.

8. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las SEQ ID NO: 3, 6, 7, 20, 26, 30-34, 45, 48, 49, 51, 54-61, 67, 71, 73, 75-79, 81, 83-86 y 91.

9. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde este tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de referencia de las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 20.

10. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 9, donde este tiene la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 3.

11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
5 1 a 10, o un solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

12. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un solvato o sal farmacéuticamente
10 aceptable de este, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso como medicamento.

13. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un solvato o sal farmacéuticamente
15 aceptable de este, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades o afecciones en las que está implicado el receptor RXFP1.

14. El péptido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o composición farmacéutica, para su uso
20 de acuerdo con la reivindicación 13, donde las enfermedades o afecciones se seleccionan a partir del grupo constituido por fibrosis; enfermedades fibróticas, en particular esclerosis sistémica, esclerodermia y fibromialgia; fibrosis pulmonar idiopática; enfermedades renales que cursan con
25 fibrosis; hipertensión pulmonar y preeclampsia.

15. El péptido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o composición farmacéutica, para su uso
de acuerdo con la reivindicación 13, donde las enfermedades o afecciones se seleccionan a partir del grupo constituido
30 por enfermedades cardíacas y vasculares, en particular a partir del grupo constituido por insuficiencia cardíaca aguda o crónica, insuficiencia cardíaca sistólica o diastólica, enfermedad coronaria arterial, aterosclerosis,

angina microvascular y complicaciones cardiovasculares de la diabetes.

16. El péptido, solvato o sal farmacéuticamente aceptable de este, o composición farmacéutica, para su uso
5 de acuerdo con la reivindicación 13, donde las enfermedades o afecciones se seleccionan a partir del grupo constituido por insuficiencias renales, en particular la disfunción renal en la cirrosis; enfermedad renal crónica y lesión renal aguda.

Resumen

SANOFI

“Péptidos de la cadena B de la Relaxina lipidados modificados y su uso terapéutico”

5

La presente invención se refiere a un péptido de Relaxina monocatenario biológicamente activo que tiene la siguiente fórmula (I):

10 N_{ter}-Ac-X₁₀-E-G-R-E-X₁₅-V-R-X₁₈-X₁₉-I-X₂₁-X₂₂-E-G-X₂₅-S-X₂₇-
X₂₈-X₂₉-X₃₀-X₃₁-X₃₂-X₃₃-NH₂-C_{ter}

o una sal o solvato de este.

También trata sobre una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de la invención, y el péptido o la composición farmacéutica para su uso como medicamento.

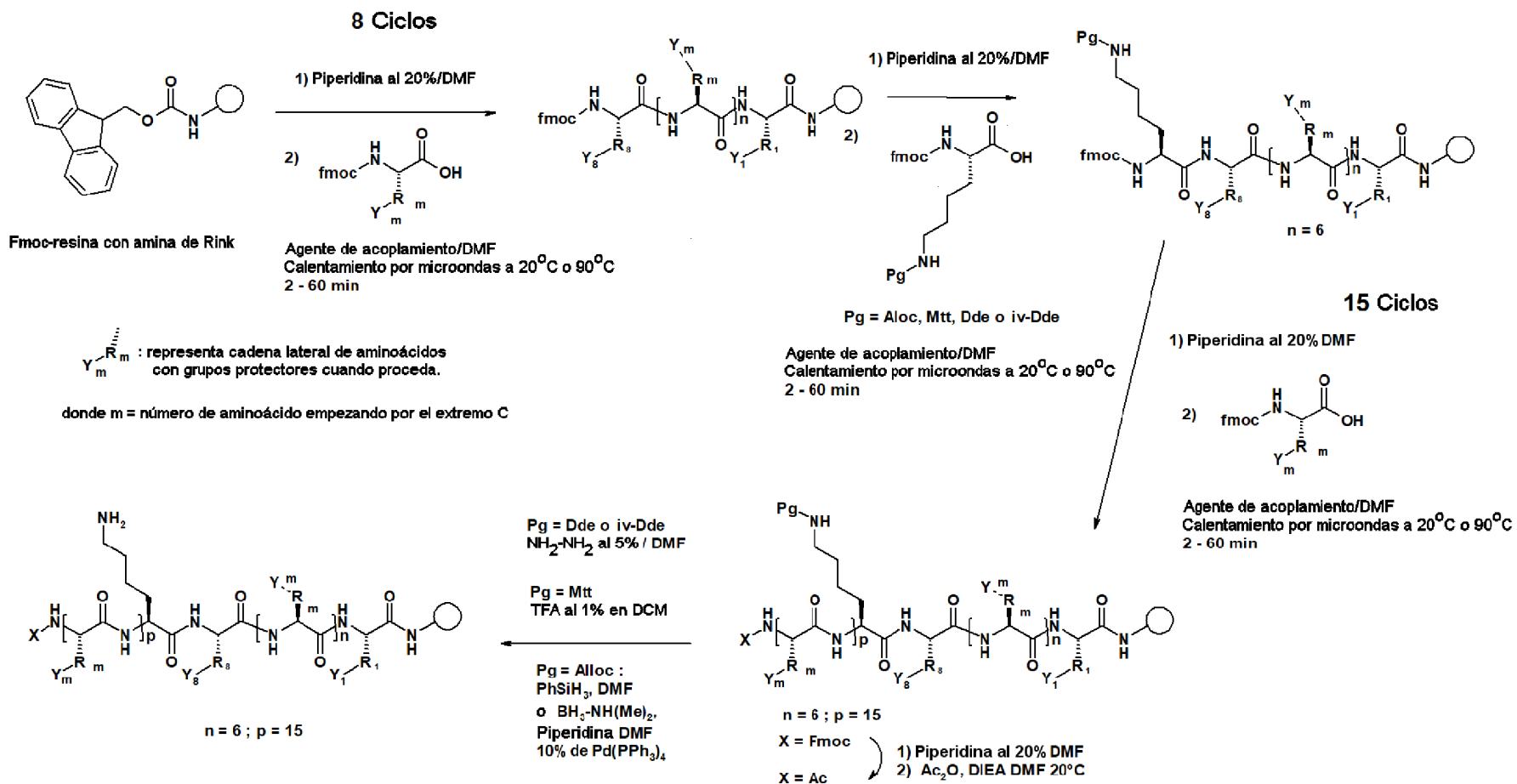
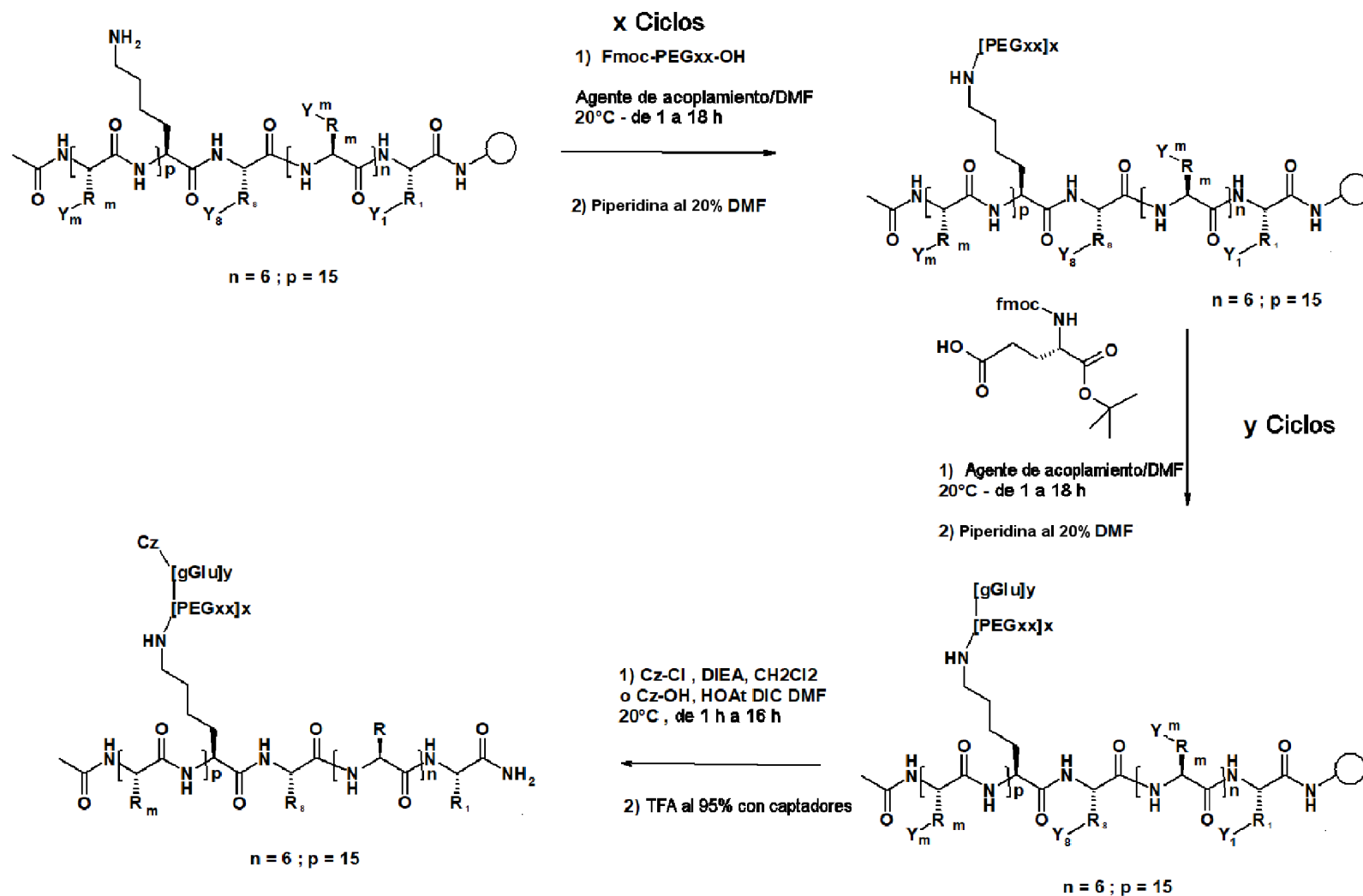


FIGURA 1

FIGURA 2