PÉPTIDO

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un péptido, una composición que contiene al péptido, y el uso del péptido.

TÉCNICA ANTECEDENTE

[0002] La miostatina es una proteína secretada, es decir, un miembro del factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), llamado también factor de diferenciación del crecimiento-8 (GDF-8). Al igual que otros miembros de la familia del TGF-β, la miostatina se sintetiza como una proteína precursora de gran tamaño que contiene un dominio de propéptido N-terminal y un dominio C-terminal, a saber, la molécula activa. Las dos moléculas del precursor de miostatina están unidas covalentemente mediante un sólo enlace disulfuro presente en el dominio C-terminal del factor de crecimiento. La miostatina madura activa (un homodímero con enlaces disulfuro que consiste en dominios C-terminales del factor de crecimiento) se libera del precursor de miostatina mediante múltiples pasos de procesamiento proteolítico.

[0003] En el primer paso de la vía de activación de la miostatina, el enlace peptídico Arg266-Asp267 entre el dominio de propéptido N-terminal y el dominio del factor de crecimiento C-terminal en ambas cadenas del precursor del homodímero es escindido por una proteína convertasa precursora de tipo furina. Sin embargo, los tres péptidos resultantes (dos propéptidos y una miostatina madura [es decir, un homodímero con enlaces disulfuro compuesto por dominios del factor de crecimiento]) permanecen asociados, formando de esta manera un complejo inactivo, no covalentemente enlazado, denominado "miostatina latente". La miostatina madura puede entonces liberarse de la miostatina latente mediante la degradación del propéptido. Los miembros de la familia de metaloproteinasas de la proteína morfogenética ósea-1 (BMP-1) escinden un enlace peptídico entre Arg98 y Asp99 dentro del propéptido, de forma concomitante con la liberación de la miostatina madura activa, que existe como un homodímero. Además, la miostatina latente puede activarse también *in vitro* disociando el complejo con tratamiento ácido o térmico (NPLs 2 y 3).

[0004] La miostatina se produce en el músculo estriado, y es un factor que regula negativamente la hipertrofia de las fibras musculares estriadas. Se ha descrito que ratones con expresión bloqueada de miostatina presentan una marcada hipertrofia del músculo esquelético (NPL 1). La regulación negativa de la hipertrofia muscular no sólo es mediada por la miostatina, sino también por el GDF-11 (véase NPL 4) y la activina A (NPL 5), que también pertenecen al grupo de la superfamilia del TGF-β. La miostatina

ejerce sus efectos a través de la familia de receptores heterotetrámeros de transmembrana de serina/treonina cinasa. Su activación es mediada por la actividad de la serina/treonina cinasa, que intensifica la transfosforilación del receptor. Las formas activadas de miostatina, GDF-11, y activina A, se unen al receptor de tipo activina IIB (ActRIIB) con alta afinidad. Después, los receptores de baja afinidad, tales como la cinasa 4 tipo activina (ALK4) o la cinasa 5 tipo activina (ALK5) entran en acción, y se activa su transfosforilación. Posteriormente, las proteínas Smad2 y Smad3 se fosforilan en el citoplasma y, después de la formación de un complejo entre ellas y Smad4, migran al núcleo para expresar sus genes objetivo (NPL 6).

[0005] Sin embargo, se sabe que el GDF-11 es eficaz para mejorar la función muscular como factor rejuvenecedor (NPL 7), y la activina actúa sobre la glándula pituitaria para inducir el efecto de promover la producción de la hormona foliculoestimulante (FSH) (NPL 8). Por lo tanto, la hipertrofia de las fibras musculares estriadas es regulada por múltiples factores con múltiples funciones. Por lo tanto, aún no se sabe con certeza qué factor o factores regulan el control de la fuerza muscular, que es una función intrínseca del músculo estriado. Se desconocían también las moléculas objetivo destinadas a mejorar la debilidad muscular en casos de distrofia muscular, atrofia muscular espinal (SMA), sarcopenia, fragilidad, caquexia, accidente cerebrovascular, etc.

[0006] En particular, se ha reportado que la concentración sanguínea de GDF-11 aumenta con el envejecimiento (NPL 9) y que disminuye (NPL 7). Por lo tanto, la función del GDF-11 en la regulación de la fuerza muscular no estaba clara.

[0007] Sin embargo, recientemente se ha demostrado que un anticuerpo anti-miostatina latente que inhibe específicamente la señalización de la miostatina muestra una mayor mejora en la fuerza muscular en un modelo de ratón de distrofia muscular de Duchenne que los anticuerpos o proteínas que también inhiben al GDF-11 y/o la activina, y que la administración de GDF-11 a un modelo de ratón de atrofia muscular resultó en una mejora en la fuerza muscular. Estos resultados experimentales sugieren que la inhibición específica de la miostatina por el anticuerpo anti-miostatina latente, constituye una estrategia terapéutica útil en las condiciones de fuerza muscular reducida (NPL 10). De igual manera, un anticuerpo anti-promiostatina, que inhibe específicamente la señalización de la miostatina, tuvo un efecto aditivo sobre la mejora de la fuerza muscular mediante el uso de un fármaco de bajo peso molecular que modifica el empalme del gen SMN2 en un modelo de ratón de SMA. Esto ha indicado que la inhibición selectiva de la miostatina mediante el anticuerpo anti-promiostatina es útil para aumentar la fuerza muscular en la SMA (NPL 11).

[0008] Con base en estos hallazgos, se han creado inhibidores selectivos de la señalización de la miostatina usando anticuerpos como los descritos anteriormente. Sin embargo, se sabe que la IgG y otros anticuerpos apenas se distribuyen en el fluido intersticial muscular (NPLs 12 y 13). Se cree que el mecanismo de acción de la miostatina en el organismo es mediado por mecanismos autocrinos,

paracrinos y endocrinos, pero principalmente por mecanismos autocrinos y paracrinos en el tejido muscular (NPL 16). Se ha reportado también que los endosomas tempranos dependientes de la clatrina participan en la señalización de Smad mediada por la superfamilia del TGF-β (NPLs 14 y 15).

[0009] Sin embargo, no se ha desarrollado composición farmacéutica alguna que inhiba la señalización de la miostatina no sólo extracelularmente, sino también intracelularmente.

Lista de citas

Literatura no de patentes

[0010] NPL 1: McPherron *et al.*, Nature 1997; 387(6628): 83-90.
NPL 2: Szlama *et al.*, FEBS J 280(16): 3822-3839 (2013).
NPL 3: Lee, PloS One 3(2): e1628 (2008).
NPL 4: Hammers *et al.*, EMBO Mol Med. 2017; 9(4): 531-44.
NPL 5: Latres *et al.*, Nat Commun. 2017; 8: 15153.
NPL 6: Lee, J Clin Invest. 2021; 131(9): e148372.
NPL 7: Sinha *et al.*, Science 2014; 344(6184): 649-52.
NPL 8: Bloise *et al.*, Physiol Rev. 2019; 99(1): 739-80.
NPL 9: Egerman *et al.*, Cell Metab. 2015; 22(1): 164-74.
NPL 10: Muramatsu *et al.*, Sci Rep. 2021; 11(1): 2160.
NPL 11: Long *et al.*, Hum Mol Genet. 2019; 28(7): 1076-89.
NPL 12: Jadhav *et al.*, J Pharm Sci. 2017; 106(9): 2853-59.
NPL 13: Wiig *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280(4): H1505-12.
NPL 14: Derynck *et al.*, Sci Signal. 2019; 12(570): 1-58.
NPL 15: Chen *et al.*, Cell Res. 2009; 19: 58-70.
NPL 16: Lee *et al.*, J Appl Physiol (1985). 2016; 120(6): 592-8.
NPL 17: Bulfield *et al.*, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1984; 81: 1189-92.
NPL 18: Fukada *et al.*, Am J Pathol. 2010; 176(5): 2414-24.
NPL 19: van Putten *et al.*, FASEB J. 2019; 33(7): 8110-24.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Problema técnico

[0011] Si la señalización de la miostatina puede inhibirse selectivamente, no sólo extracelularmente, sino también intracelularmente, por ejemplo, tanto en el fluido intersticial muscular como en el citoplasma, cabe esperar un efecto inhibidor mayor sobre la señalización de la miostatina que el

logrado por los anticuerpos. Si se logra obtener un compuesto con este efecto, se espera que tenga un mayor efecto intensificador de la fuerza muscular que los compuestos o anticuerpos desarrollados previamente, y que sirva como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades o síntomas asociados con la función muscular reducida, como la distrofia muscular y la atrofia muscular espinal (SMA).

[0012] Los presentes inventores han llevado a cabo una intensa investigación para crear un compuesto con actividad inhibidora de la miostatina y, como resultado, han concebido la presente invención. La presente invención provee un péptido novedoso con actividad inhibidora de la miostatina, una composición que contiene al péptido, y el uso del péptido.

Solución al problema

[0013] Aunque no limitada, la presente solicitud incluye los siguientes ítems de la invención.

[1]

Un péptido que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15 (SEQ ID NO: 2); o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde:

X1 es cualquier aminoácido o peptoide;

X2 es cualquier aminoácido;

X3 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X4 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X5 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral;

X7 es cualquier aminoácido secundario, N-alquilaminoácido o peptoide;

X8 es cualquier aminoácido;

X9 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X10 es R;

X11 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X12 es un aminoácido alifático opcionalmente sustituido o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

X13 es cualquier aminoácido secundario, N-alquilaminoácido o peptoide;

X14 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral; y

X15 es cualquier aminoácido.

[2]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde se satisfacen uno o dos o más de los siguientes requisitos:

X1 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral o un peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral unida a un nitrógeno de amida;

X3 es F o W opcionalmente sustituido;

X4 es F o Y opcionalmente sustituido, o naftilalanina;

X5 es F, Y o naftilalanina opcionalmente sustituidos, o ciclohexilalanina opcionalmente sustituida;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo ramificado, o un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo, en donde un átomo de carbono contenido en el mismo es opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno;

X8 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X9 es F o Y opcionalmente sustituido, o un aminoácido que contiene un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral, o alanina;

X12 es un aminoácido alifático que contiene tres o más átomos de carbono en una cadena lateral, o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

X13 es un N-alquilaminoácido;

X14 es F o Y opcionalmente sustituido; y

X15 es un aminoácido que tiene un elemento de azufre (S) en el extremo de la cadena lateral.

[3]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde se satisfacen uno o dos o más de los siguientes requisitos:

X1 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral o un peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral unida al nitrógeno de amida;

X3 es F o W opcionalmente sustituido;

X4 es F o Y opcionalmente sustituido, o naftilalanina;

X5 es F, Y o naftilalanina opcionalmente sustituidos, o ciclohexilalanina opcionalmente sustituida;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo ramificado, o un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo, en donde un átomo de carbono contenido en el mismo es opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno;

X8 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X9 es F o Y opcionalmente sustituido, o un aminoácido que contiene un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral, o alanina;

X12 es un aminoácido alifático que contiene tres o más átomos de carbono en una cadena lateral, o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

X13 es un N-alquilaminoácido;

X14 es F o Y opcionalmente sustituido; y

X15 es un aminoácido alifático, y está además unido a un aminoácido alifático o prolina como X16.

[4]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde se satisfacen uno o dos o más de los siguientes requisitos:

X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl;

X2 es R, Dap, K, E, A, da, S, G, de, dkCOpipzaa, ddab o dorn;

X3 es W, W7N, F44Py, Bph, W6N, F41dMeCmm4Pyz, W1Bn, W6H, W1Ph, Bph4ms, W1aa, W7Ph3C, W1Ph4OMe, W1Ph4COO, F42Py o W6H1Ph4COO;

X4 es Y, 3Py6NH2, YBn, Yae, Nal1, Yph o mBph;

X5 es MeF, MeY, MeF3Me, F, MeCha, MeYap, MeA1Ac4pip, MemBph, MeNal1, MeNal2, MeF4OMe o MeF4C;

X6 es I, Gcpe o TMe;

X7 es MeG, MeA, Meda, dp, EtG o PrG;

X8 es Y, F4COO, K, 4Py, F, F3aao, F3OMe, A4paa, KCOpipzaa, Bph2C, Bph2OMe o pBph2aao;

X9 es Y, F4COO, 3Py, 4Py, F4aao, F4CON, F3CON, F4F o F4OMe;

X11 es MeF, Me4Py, Me3Py, F, Cha, MeCha, MeK, MeKMe, MeF4am, MeD, MeE, MeF4COO o F4am;

X12 es L, Ahp, Ano, Ado, Ade, Aoc, SPent, HseBu, AhpOMe, HsePr o Aun;

X13 es MeA, MeE, MeKCOpipzaa, MeK, MeDap o MeDab;

X14 es MeF, MeF3Et, Me4Py, Me3Py o MemBph; y

X15 es C, MeC, dc, Medc, dhcy, Hcy o de.

[5]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde se satisfacen uno o dos o más de los siguientes requisitos:

X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl;

X2 es R, Dap, K, E, A, da, S, G, de, dkCOpipzaa, ddab o dorn;

X3 es W, W7N, F44Py, Bph, W6N, F41dMeCmm4Pyz, W1Bn, W6H, W1Ph, Bph4ms, W1aa, W7Ph3C, W1Ph4OMe, F42Py, W1Ph4COO o W6H1Ph4COO;

X4 es Y, 3Py6NH2, YBn, Yae, Nal1, Yph o mBph;

X5 es MeF, MeY, MeF3Me, F, MeCha, MeYap, MeA1Ac4pip, MemBph, MeNal1, MeNal2, MeF4OMe o MeF4C;

X6 es I, Gcpe o TMe;

X7 es MeG, MeA, Meda, dp, EtG o PrG;

X8 es Y, F4COO, K, 4Py, F, F3aao, F3OMe, A4paa, KCOpipzaa, Bph2C, Bph2OMe o pBph2aao;

X9 es Y, F4COO, 3Py, 4Py, F4aao, F4CON, F3CON, F4F o F4OMe;

X11 es MeF, Me4Py, Me3Py, F, Cha, MeCha, MeK, MeKMe, MeF4am, MeD, MeE, MeF4COO o F4am;

X12 es L, Ahp, Ano, Ado, Ade, Aoc, SPent, HseBu, AhpOMe, HsePr o Aun;

X13 es MeA, MeE, MeKCOpipzaa, MeK, MeDap o MeDab;

X14 es MeF, MeF3Et, Me4Py, Me3Py o MemBph; y

X15 es Aeoac, Ape, dhgl, Hgl, MeHgl, Medhgl, MeAeoac o MeApe, o X15 es G, da, A o de y está unido a MeA, Meda, G, da, MeG, P o A como X16.

[6]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], en donde se satisfacen uno o dos de los siguientes requisitos:

X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl; y

X15 es Aeoac, Ape, dhgl, Hgl, MeHgl, Medhgl, MeAeoac o MeApe, o X15 es G, da, A o de y está unido a MeA, Meda, G, da, MeG, P o A como X16.

[7]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [1], el péptido incluyendo o consistiendo en una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 2 a 368.

[8]

Un péptido que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C (SEQ ID NO: 1), o

una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, deleción o inserción en 1 a 14 residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácido en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15 en la secuencia de aminoácidos anterior; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[9]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], en donde el péptido es un péptido cíclico.

[10]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1], [2], [4], [6], [7] y [8], que tiene una estructura cíclica en la cual un aminoácido cloroacetilado está unido a un residuo de cisteína incluido en el péptido.

[11]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1], [3], [5], [6] y [7], que tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un residuo de aminoácido en la posición 1 incluido en el péptido está unido a un grupo carboxi de un residuo de aminoácido en la posición 15.

[12]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1], [3], [5], [6] y [7], que tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un residuo de aminoácido en la posición 1 incluido en el péptido está unido a un grupo carboxi de un residuo de aminoácido en la posición 16.

[13]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [9], en donde el péptido incluye además una estructura de entrelazamiento.

[14]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [9], que tiene una estructura de entrelazamiento entre cualquiera de X1, X2 o X3 y X11 o X13.

[15]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con [12], el péptido incluyendo o consistiendo en una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 238-290, 326-329, 334-338, 348-354, 358-360, 362-366 y 368.

[16]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], que incluye además un residuo de aminoácido adicional.

[17]

El péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], incluyendo un enlazador en un extremo C-terminal del mismo.

[18]

Una composición farmacéutica que incluye el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con cualquiera de [1] a [8].

[19]

La composición farmacéutica de acuerdo con [18], que tiene actividad inhibidora de la miostatina.

[20]

La composición farmacéutica de acuerdo con [18], para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[21]

Un método para inhibir la señalización de la miostatina, que incluye el uso del péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8].

[22]

Una composición de diagnóstico que incluye el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8], para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[23]

Un método para poner a prueba un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo la prueba de por lo menos uno de:

a) solubilidad en un solvente,

b) actividad inhibidora de la miostatina,

c) toxicidad celular y/o tisular, o

d) toxicidad para un animal de experimentación,

en donde el péptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es el péptido o sal

farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de [1] a [8].

Efectos ventajosos de la invención

[0014] El péptido de la presente invención tiene actividad inhibidora de la miostatina y, por lo tanto, es útil como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida, una composición de diagnóstico y una composición de investigación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015] [Fig. 1] La figura 1 son gráficas que muestran los resultados de la actividad inhibidora *in vitro* de Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) contra miostatina, GDF-11 y activina A, medida mediante una prueba de gen reportero para la señalización de miostatina en células de TGF-β HEK-Blue (marca registrada). (A) Resultados de la actividad inhibidora contra miostatina y GDF-11, y (B) resultados de la actividad contra activina A. Los círculos negros indican los resultados de la actividad contra miostatina, los círculos blancos indican los resultados de la actividad contra GDF-11, y los cuadrados blancos indican los resultados de la actividad contra activina A. Nótese que la abscisa indica la concentración de péptido (nM), y la ordenada indica el % de inhibición, en donde el estado no estimulado es 0% de inhibición, y la actividad inhibidora máxima ejercida por el péptido es 100% de inhibición.

[Fig. 2-1] La figura 2 muestra gráficas de los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal de ratones de tipo silvestre durante la administración de cada péptido de la presente invención. Los cuadrados negros en A muestran los resultados de la administración de 1 mg/kg de Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3), los triángulos negros muestran los resultados de la administración del mismo péptido a 3 mg/kg, y los círculos grises muestran los resultados de la administración de PBS como control, respectivamente. Los cuadrados negros, triángulos negros, cuadrados blancos y triángulos blancos en B muestran los resultados de la administración del péptido Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) a 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente, y los círculos grises muestran los resultados de la administración de PBS como control. La abscisa indica el número de días después de la administración, y la ordenada indica el cambio en el peso corporal (gramos) de los ratones después de la administración.

[Fig. 2-2] La figura 2 muestra gráficas de los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal de ratones de tipo silvestre durante la administración de cada péptido de la presente invención. Los cuadrados y triángulos negros en C muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_v148 (SEQ ID NO: 31) a 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg, respectivamente, y los círculos grises muestran los resultados de la administración de PBS como control. Los cuadrados negros, triángulos

negros y cuadrados blancos en D muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_v194 (SEQ ID NO: 65) a 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente, y los círculos grises muestran los resultados de la administración de PBS como control. Los cuadrados negros en E muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_v200 (SEQ ID NO: 71) a 10 mg/kg, y los círculos grises muestran los resultados de la administración de PBS como control. La abscisa indica el número de días después de la administración, y la ordenada indica la variación en el peso corporal (gramos) de los ratones después de la administración.

[Fig. 3] La figura 3 es una gráfica que muestra las mejoras en el transcurso del tiempo en la fuerza de agarre y los cambios en el peso corporal de ratones B10 mdx durante la administración del péptido de la presente invención. Los cuadrados negros muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3) a 10 mg/kg, y los círculos blancos muestran los resultados de la administración de PBS como control. La abscisa indica el número de días después de la administración, y la ordenada indica el cambio en la fuerza de agarre.

[Fig. 4] La figura 4 es una gráfica que muestra los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal de ratones B10 mdx durante la administración del péptido de la presente invención. Los cuadrados negros muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3) a 10 mg/kg, y los círculos blancos muestran los resultados de la administración de PBS como control. La abscisa indica el número de días después de la administración, y la ordenada indica el cambio en el peso corporal.

[Fig. 5] La figura 5 es una gráfica que muestra los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal de ratones DBA/2 mdx durante la administración del péptido de la presente invención o GYM329-BS. Los círculos y cuadrados blancos muestran los resultados de la administración de Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) a 1 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente; los triángulos negros muestran los resultados de la administración de GYM329-BS a 10 mg/kg, y los triángulos blancos muestran los resultados de la administración de PBS como control. La abscisa indica la edad (semanas) de los ratones, y la ordenada indica el cambio en la fuerza de agarre.

[Fig. 6] La figura 6 es una gráfica que muestra los cambios en el transcurso del tiempo en el peso corporal de ratones DBA/2 mdx durante la administración del péptido de la presente invención o GYM329-BS. Los círculos blancos muestran los resultados de la administración subcutánea de Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) a 3 mg/kg, y los triángulos negros muestran los resultados de la administración oral del mismo péptido a 65 mg/kg, y los triángulos negros invertidos muestran los resultados de la administración oral del mismo péptido a 200 mg/kg. La abscisa indica la edad (semanas) de los ratones, y la ordenada indica el cambio en la fuerza de agarre.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES

[0016] Aunque no limitada, la presente invención incluye las siguientes modalidades. A menos que se indique de otra manera en la presente, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que los que habitualmente entienden los expertos en la técnica. Las sustancias, materiales y ejemplos descritos en la presente son meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitativos. La referencia a "en una modalidad" en la presente, significa que no se limita a la modalidad, es decir, no es limitada.

[0017] 1. Abreviaturas

Como se usa en la presente, las siguientes abreviaturas se usan con los siguientes significados, a menos que se indique de otra manera.

[0018] Abreviaturas (generales)

Å: angstrom (unidad);
ClAc: cloroacetilo;
Cy5SAlk: sulfo-Cy5-alquino;
DCM: diclorometano;
TIPS: triisopropilsililo;
tBu: *ter*-butilo;
DTT: ditiotreitol;
DMSO: sulfóxido de dimetilo;
Trt: tritilo;
Boc: *ter*-butoxicarbonilo;
DMF: N,N-dimetilformamida;
DIEA o DIPEA: N,N-diisopropiletilamina;
DIPCI o DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimida;
Oxima pura: ciano(hidroxiimino)acetato de etilo;
DODT: 3,6-dioxa-1,8-octano-ditiol;
Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo;
g: gramo (unidad);
HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio;
HOSu: N-hidroxisuccinimida;
CLAR: cromatografía de líquidos de alto rendimiento;
LC-MS o LC/MS: cromatografía de líquidos espectrómetro de masas;

mL: mililitro (unidad);

M: molar (unidad);

μL: microlitro (unidad);

mM: milimolar (unidad);

μM: micromolar (unidad);

mmoles: milimoles (unidad);

mg: miligramo (unidad);

MeCN o CH_3CN: acetonitrilo;

min: minuto(s) (unidad) min;

mm: milímetro (unidad);

μm: micrómetro (unidad);

nm: nanómetro (unidad);

nM: nanomolar (unidad);

OSu: succinimida;

PEG: polietilenglicol;

rpm: revoluciones por minuto (unidad);

tBu: *ter*-butilo;

TFA: ácido trifluoroacético;

TIS: triisopropilsilano;

Trt o Tr: grupo tritilo;

H-PEG4Me: 2.5,8,11-tetraoxatridecan-13-amina;

H-PEG8Me: 2.5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-amina;

AA: aminoácido;

PyAOP: hexafluorofosfato de 7-((azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio;

CSA: ácido 10-alcanforsulfónico;

Fmoc-OSu: N-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida;

THF: tetrahidrofurano;

ClAcOSu: N-(cloroacetoxi)succinimida;

$Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$: complejo de tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0)-cloroformo;

SPhos: 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo;

EDCI·HCl: clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida;

$Pd(PPh_3)_4$: tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0);

ClAcOH: ácido cloroacético;

conc: concentración;

HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol;

Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;

Alloc: aliloxicarbonilo;

Boc-NH-PEG9-NH_2: (29-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosil)carbamato de ter-butilo;

Biotin-OSu: 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoato de 2.5-dioxopirrolidin-1-ilo; y

TEAA: acetato de trietilamonio.

[0019] Abreviaturas (aminoácidos no naturales)

Las abreviaturas que aparecen a continuación para aminoácidos no naturales incluyen aquellos en los cuales el grupo amino de la cadena principal es protegido por un grupo protector común, tal como un grupo Boc o Fmoc.

MeA: ácido (2S)-2-(metilamino)propanoico (CAS 3913-67-5)

Dap: ácido (2S)-2,3-diaminopropanoico (CAS 4033-39-0)

ApG: ácido 2-[(3-aminopropil)amino]acético (CAS 2875-41-4)

CrpG: ácido 4-((carboximetil)amino)butanoico (CAS 4386-04-3)

CmG: ácido 2-[(2-carbamoiletil)amino]acético (CAS 34299-32-6)

MeD: ácido (2S)-2-(metilamino)butanodioico (CAS 4226-18-0)

CrmG: ácido 2,2'-iminodiacético (CAS 142-73-4)

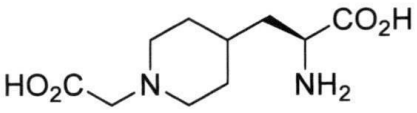
MeopG: ácido 2-[(3-metoxipropil)amino]acético (CAS 807261-81-0)

MeeG: ácido 2-[(2-metoxietil)amino]acético (CAS 205124-55-6)

AcapG: ácido 2-[(3-acetamidopropil)amino]acético (CAS 1862908-81-3)

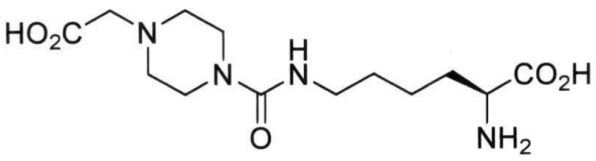
A4paa: ácido (S)-2-amino-3-(1-(carboximetil)piperidin-4-il)propanoico.

[0020] [Fórmula química 1]



KCOpipzaa: ácido (2S)-2-amino-6-{[4-(carboximetil)piperazin-1-carbonil]amino}hexanoico

[0021] [Fórmula química 2]



CeG: ácido 3-((carboximetil)amino)propanoico (CAS 505-72-6)

CrbG: ácido 5-((carboximetil)amino)pentanoico (CAS 72253-27-1)

KMe: ácido (2S)-2-amino-6-(metilamino)hexanoico (CAS 1188-07-4)

Hly: ácido (2S)-2,7-diaminoheptanoico (CAS 37689-89-7)

Hgl: ácido (S)-2-aminohexanodioico (CAS 1118-90-7)

Orn: ácido (2S)-2.5-diaminopentanoico (CAS 70-26-8)

Dab: ácido (2S)-2,4-diaminobutanoico (CAS 1758-80-1)

MeE: ácido (2S)-2-(metilamino)pentanodioico (CAS 6753-62-4)

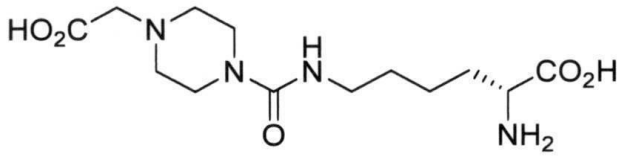
da: D-alanina (CAS 338-69-2)

Aib: ácido 2-amino-2-metilpropanoico (CAS 62-57-7)

de: ácido D-glutámico (CAS 6893-26-1)

dkCOpipzaa: ácido (2R)-2-amino-6-{[4-(carboximetil)piperazin-1-carbonil]amino}hexanoico

[0022] [Fórmula química 3]



ddab: ácido (2R)-2,4-diaminobutanoico (CAS 26908-94-1)

dorn: ácido (2R)-2.5-diaminopentanoico (CAS 348-66-3)

MeW: ácido (S)-3-(1H-indol-3-il)-2-(metilamino)propanoico (CAS 526-31-8)

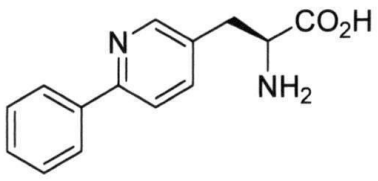
W7N: ácido (S)-2-amino-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il)propanoico (CAS 49758-35-2)

W4C: ácido (S)-2-amino-3-(4-cloro-1H-indol-3-il)propanoico (CAS 52448-14-3)

Bph: ácido (S)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-aminopropanoico (CAS 155760-02-4)

3Py6Ph: ácido (S)-2-amino-3-(6-fenilpiridin-3-il)propanoico

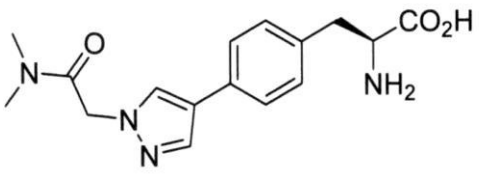
[0023] [Fórmula química 4]



W6N: ácido (S)-2-amino-3-(1H-pirrolo[2,3-c]piridin-3-il)propanoico (CAS 149704-63-2)

F41dMeCmm4Pyz: ácido (S)-2-amino-3-(4-(1-(2-(dimetilamino)-2-oxoetil)-1H-pirazol-4-il)fenil)propanoico

[0024] [Fórmula química 5]

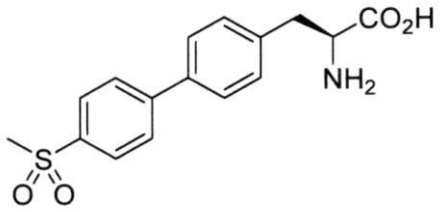


W1Bn: ácido (2S)-2-amino-3-(1-bencil-1H-indol-3-il)propanoico (CAS 740-11-4)

W6H: ácido (S)-2-amino-3-(6-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico (CAS 13567-14-1)

Bph4ms: ácido (S)-2-amino-3-(4'-(metilsulfonil)-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoico

[0025] [Fórmula química 6]

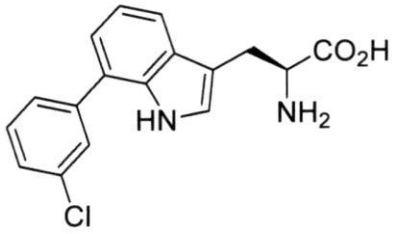


W1Ph: ácido (2S)-2-amino-3-(1-fenil-1H-indol-3-il)propanoico (CAS 1224881-37-1)

W1aa: ácido (2S)-2-amino-3-[1-(carboximetil)-1H-indol-3-il]propanoico (CAS 773823-50-0)

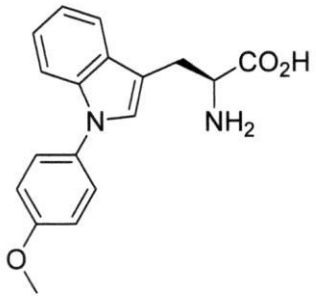
W7Ph3C: ácido (S)-2-amino-3-(7-(3-clorofenil)-1H-indol-3-il)propanoico

[0026] [Fórmula química 7]



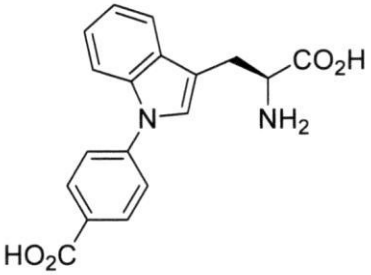
W1Ph4OMe: ácido (2S)-2-amino-3-(1-(4-metoxifenil)-1H-indol-3-il)propanoico

[0027] [Fórmula química 8]



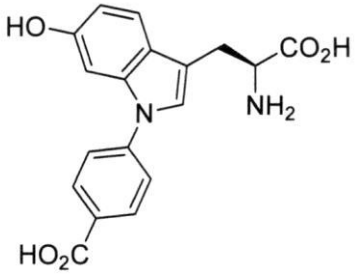
W1Ph4COO: ácido 4-{3-[(2S)-2-amino-2-carboxietil]-1H-indol-1-il}benzoico

[0028] [Fórmula química 9]



W6H1Ph4COO: ácido (S)-4-(3-(2-amino-2-carboxietil)-6-(hidroxi-1H-indol-1-il)benzoico

[0029] [Fórmula química 10]



3Py6NH2: ácido (S)-2-amino-3-(6-aminopiridin-3-il)propanoico (CAS 1269968-61-7)

Yph: ácido (S)-2-amino-3-(4-fenoxifenil)propanoico (CAS 150351-64-7)

F4CON: ácido (S)-2-amino-3-(4-carbamoilfenil)propanoico (CAS 223593-04-2)

YBn: ácido (S)-2-amino-3-(4-(benciloxi)fenil)propanoico (CAS 16652-64-5)

Yae: ácido (S)-2-amino-3-(4-(2-aminoetoxi)fenil)propanoico (CAS 1909283-20-0)

Nal1: ácido (S)-2-amino-3-(naftalen-1-il)propanoico (CAS 55516-54-6)

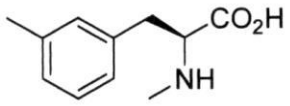
mBph: ácido (S)-3-([1,1'-bifenil]-3-il)-2-aminopropanoico (CAS 164172-96-7)

MeF: ácido (2S)-2-(metilamino)-3-fenilpropanoico (CAS 2566-30-5)

MeY: ácido (2S)-3-(4-hidroxifenil)-2-(metilamino)propanoico (CAS 537-49-5)

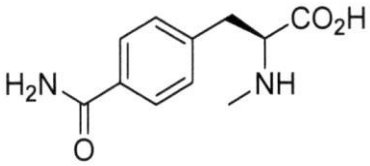
MeF3Me: ácido (S)-2-(metilamino)-3-(meta-tolil)propanoico

[0030] [Fórmula química 11]



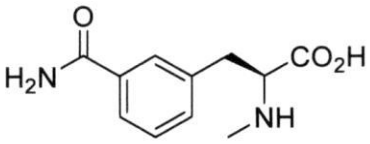
MeF4CON: ácido (S)-3-(4-carbamoilfenil)-2-(metilamino)propanoico

[0031] [Fórmula química 12]



MeF3CON: ácido (S)-3-(3-carbamoilfenil)-2-(metilamino)propanoico

[0032] [Fórmula química 13]

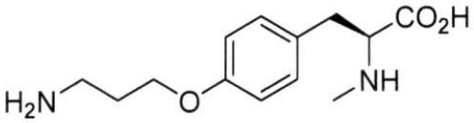


F3CON: ácido (S)-2-amino-3-(3-carbamoilfenil)propanoico (CAS 1217651-22-3)

MeCha: ácido (S)-3-ciclohexil-2-(metilamino)propanoico (CAS 2165389-05-7)

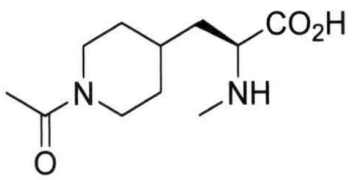
MeYap: ácido (S)-3-(4-(3-aminopropoxi)fenil)-2-(metilamino)propanoico

[0033] [Fórmula química 14]



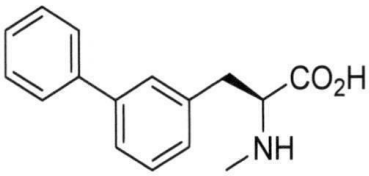
MeA1Ac4pip: ácido (S)-3-(1-acetilpiperidin-4-il)-2-(metilamino)propanoico

[0034] [Fórmula química 15]



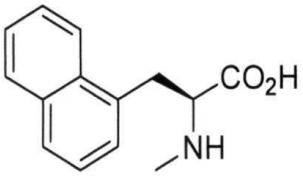
MemBph: ácido (S)-3-([1,1'-bifenil]-3-il)-2-(metilamino)propanoico

[0035] [Fórmula química 16]



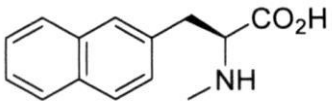
MeNal1: ácido (S)-2-(metilamino)-3-(naftalen-1-il)propanoico

[0036] [Fórmula química 17]



MeNal2: ácido (S)-2-(metilamino)-3-(naftalen-2-il)propanoico

[0037] [Fórmula química 18]



MeF4OMe: ácido (S)-3-(4-metoxifenil)-2-(metilamino)propanoico (CAS 52939-33-0)

MeF4C: ácido (S)-3-(4-clorofenil)-2-(metilamino)propanoico (CAS 347851-70-1)

Eva: ácido (S)-2-amino-3-etilpentanoico (CAS 14328-49-5)

Cbg: ácido (S)-2-amino-2-ciclobutilacético (CAS 49607-08-1)

Gcpe: ácido (S)-2-amino-2-ciclopentilacético (CAS 2521-84-8)

TMe: ácido (2S,3R)-2-amino-3-metoxibutanoico (CAS 4144-02-9)

MeG: ácido 2-(metilamino)acético (CAS 107-97-1)

Meda: ácido (2R)-2-(metilamino)propanoico (CAS 29475-64-7)

dp: D-prolina (CAS 344-25-2)

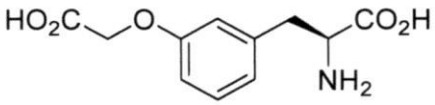
EtG: ácido 2-(etilamino)acético (CAS 627-01-0)

PrG: ácido 2-(propilamino)acético (CAS 25303-14-4)

F3aa: ácido (S)-2-amino-3-(3-(carboximetil)fenil)propanoico (CAS 1270107-31-7)

F3aao: ácido (S)-2-amino-3-(3-(carboximetoxi)fenil)propanoico

[0038] [Fórmula química 19]



F4aa: ácido (S)-2-amino-3-(4-(carboximetil)fenil)propanoico (CAS 142348-77-4)

F4aao: ácido (S)-2-amino-3-(4-(carboximetoxi)fenil)propanoico (CAS 24558-63-2)

F4C: ácido (S)-2-amino-3-(4-clorofenil)propanoico (CAS 14173-39-8)

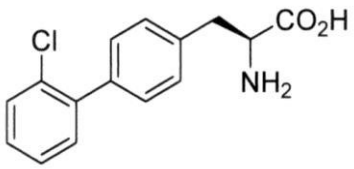
F3OMe: ácido (S)-2-amino-3-(3-metoxifenil)propanoico (CAS 33879-32-2)

F3COO: ácido (S)-3-(2-amino-2-carboxietil)benzoico (CAS 13861-02-4)

KAc: ácido (2S)-2-amino-6-acetamidohexanoico (CAS 692-04-6)

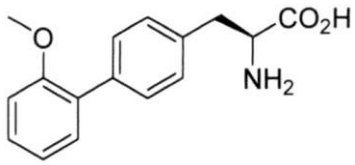
Bph2C: ácido (S)-2-amino-3-(2'-cloro-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoico

[0039] [Fórmula química 20]



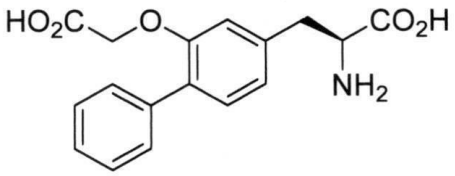
Bph2OMe: ácido (S)-2-amino-3-(2'-metoxi-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoico

[0040] [Fórmula química 21]



pBph2aao: ácido (S)-2-amino-3-(2'-(carboximetoxi)-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoico

[0041] [Fórmula química 22]



F4COO: ácido (S)-4-(2-amino-2-carboxietil)benzoico (CAS 126109-42-0)

3Py: ácido (S)-2-amino-3-(piridin-3-il)propanoico (CAS 64090-98-8)

4Py: ácido (S)-2-amino-3-(piridin-4-il)propanoico (CAS 37535-49-2)

F4F: ácido (S)-2-amino-3-(4-fluorofenil)propanoico (CAS 1132-68-9)

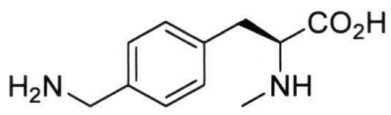
F4OMe: ácido (S)-2-amino-3-(4-metoxifenil)propanoico (CAS 6230-11-1)

Cha: ácido (S)-2-amino-3-ciclohexilpropanoico (CAS 27527-05-5)

MeKMe: ácido (2S)-2,6-bis(metilamino)hexanoico (CAS 51876-34-7)

MeF4am: ácido (S)-3-(4-(aminometil)fenil)-2-(metilamino)propanoico

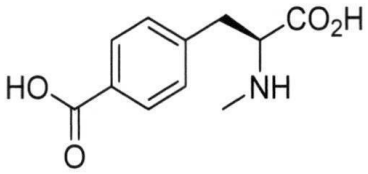
[0042] [Fórmula química 23]



MeDap: ácido (S)-3-amino-2-(metilamino)propanoico (CAS 904832-42-4)

MeF4COO: ácido (S)-4-(2-carboxi-2-(metilamino)etil)benzoico

[0043] [Fórmula química 24]



F4am: ácido (S)-2-amino-3-(4-(aminometil)fenil)propanoico (CAS 150338-20-8)

Ahp: ácido (S)-2-aminoheptanoico (CAS 1115-90-8)

Ano: ácido (S)-2-aminononanoico (CAS 133444-84-5)

Ado: ácido (S)-2-aminododecanoico (CAS 169106-34-7)

Ade: ácido (S)-2-aminodecanoico (CAS 84277-81-6)

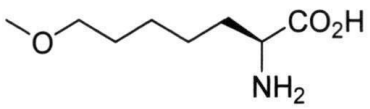
Aoc: ácido (S)-2-aminooctanoico (CAS 116783-26-7)

SPent: ácido (2S)-2-amino-3-(pentiloxi)propanoico (CAS 1502644-74-7)

HseBu: ácido (2S)-2-amino-4-butoxibutanoico (CAS 17673-71-1)

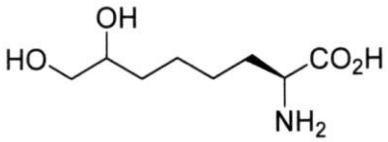
AhpOMe: ácido (S)-2-amino-7-metoxiheptanoico

[0044] [Fórmula química 25]



Aoc7r8dH: ácido (2S)-2-amino-7,8-dihidroxioctanoico

[0045] [Fórmula química 26]



HsePr: ácido (2S)-2-amino-4-propoxibutanoico (CAS 18312-28-2)

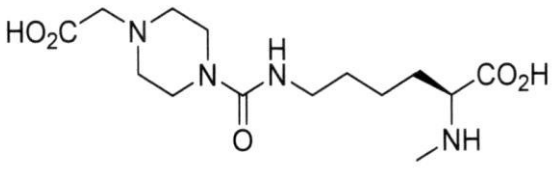
AhpOH: ácido (S)-2-amino-7-hidroxiheptanoico (CAS 2136908-21-7)

Aun: ácido (S)-2-aminoundecanoico (CAS 169106-34-7)

MeK: ácido (2S)-6-amino-2-(metilamino)hexanoico (CAS 7431-89-2)

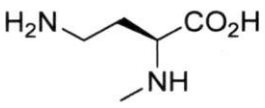
MeKCOpipzaa: ácido (2S)-6-{[4-(carboximetil)piperazin-1-carbonil]amino}-2-(metilamino)hexanoico

[0046] [Fórmula química 27]



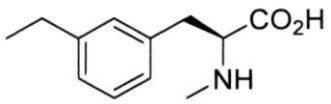
MeDab: ácido (S)-4-amino-2-(metilamino)butanoico

[0047] [Fórmula química 28]



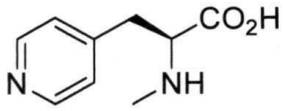
MeF3Et: ácido (S)-3-(3-etilfenil)-2-(metilamino)propanoico

[0048] [Fórmula química 29]



Me4Py: ácido (S)-2-(metilamino)-3-(piridin-4-il)propanoico

[0049] [Fórmula química 30]



Me3Py: ácido (S)-2-(metilamino)-3-(piridin-3-il)propanoico (CAS 2651172-69-7)

MeC: ácido (2R)-2-(metilamino)-3-sulfanilpropanoico (CAS 4026-48-6)

dc: D-cisteína (CAS 921-01-7)

Medc: ácido (2S)-2-(metilamino)-3-sulfanilpropanoico (CAS 95244-61-4)

dhcy: ácido (2R)-2-amino-4-sulfanilbutanoico (CAS 6027-14-1)

Hcy: ácido (2S)-2-amino-4-sulfanilbutanoico (CAS 6027-13-0)

Aeoac: ácido 2-(2-aminoetoxi)acético (CAS 10366-71-9)

Ape: ácido 5-aminopentanoico (CAS 660-88-8)

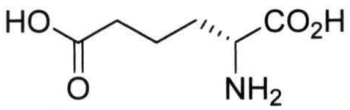
dhgl: ácido (R)-2-aminohexanodioico (CAS 7620-28-2)

Hgl: ácido (S)-2-aminohexanodioico (CAS 1118-90-7)

MeHgl: ácido (S)-2-(metilamino)hexanodioico (CAS 261943-13-9)

Medhgl: ácido (R)-2-(metilamino)hexanodioico

[0050] [Fórmula química 31]



MeAeoac: ácido 2-(2-(metilamino)etoxi)acético (CAS 98137-58-7)

MeApe: ácido 5-(metilamino)pentanoico (CAS 21382-30-9)

pipzAc: ácido 2-(piperazin-1-il)acético (CAS 37478-58-3)

pipAc: ácido 2-(piperidin-4-il)acético (CAS 51052-78-9)

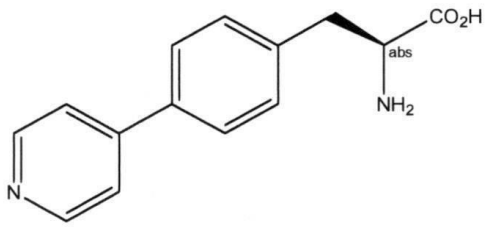
Pip4mAc: ácido 3-(piperidin-4-il)propanoico (CAS 1822-32-8)

Pic4: ácido piperidin-4-carboxílico (CAS 498-94-2)

F42Py: ácido (2S)-2-amino-3-[4-(piridin-2-il)fenil]propanoico (CAS 1336207-47-6)

F44Py: ácido (2S)-2-amino-3-[4-(piridin-4-il)fenil]propanoico

[0051] [Fórmula química 32]



cC14COO: ácido hexadecanodioico (CAS 505-54-4)

cC16COO: ácido octadecanodioico (CAS 871-70-5)

PEG9NH2: 3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonacosan-1,29-diamina (CAS 474082-35-4)

Biotina: ácido 5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoico (CAS 58-85-5)

PEG12c: ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxanonatriacontan-39-oico (CAS 1415408-69-3).

[0052] 2. Péptido (A)

La presente invención se refiere a un péptido o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las referencias a "péptido" en la presente incluyen también referencias a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o a un solvato del mismo, a menos que se indique de otra manera.

[0053] Un aspecto de la presente invención provee un péptido que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C (SEQ ID NO: 1), o

una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución, adición, deleción o inserción en 1 a 14 residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácido en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15 en la secuencia de aminoácidos anterior.

(Péptido (A))

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C (SEQ ID NO: 1) es un péptido que se confirmó tiene actividad inhibidora de la miostatina en los ejemplos incluidos en la presente.

[0054] La secuencia de aminoácidos puede presentar una sustitución, adición, deleción o inserción de 1 a 14 residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácido en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15 en SEQ ID NO: 1. El número de sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos debe ser 1 o más y 14 o menos, siendo el límite

inferior 1. El límite superior puede ser 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2, y el mínimo es 1. Se prefiere una "sustitución" de aminoácidos. Dicha sustitución de aminoácidos es de preferencia una sustitución conservativa de aminoácidos.

[0055] El término "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a una sustitución con un aminoácido funcionalmente equivalente o similar. Una sustitución conservativa de aminoácidos en un péptido causa un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del mismo. Por ejemplo, uno, dos o más aminoácidos con polaridad similar actúan de forma funcionalmente equivalente para producir un cambio estático en la secuencia de aminoácidos de dicho péptido. En general, una sustitución dentro de un grupo puede considerarse estructural y funcionalmente conservativa. Sin embargo, como es obvio para los expertos en la técnica, la función que desempeña un residuo de aminoácido en particular puede determinarse por su importancia en la estructura tridimensional de la molécula que lo contiene. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede adoptar una forma oxidada (disulfuro) menos polar cuando se compara con la forma reducida (tiol). La larga porción alifática de una cadena lateral de arginina puede constituir una característica estructural y funcionalmente importante. Además, una cadena lateral con un anillo aromático (de triptófano, tirosina o fenilalanina) puede contribuir a una interacción de ión-aromática o de catión-pi. En dichos casos, la sustitución de un aminoácido con dicha cadena lateral por un aminoácido perteneciente a un grupo ácido o no polar puede ser estructural y funcionalmente conservativa. Un residuo como la prolina, la glicina o la cisteína (forma de disulfuro) puede tener un efecto directo sobre la conformación de la cadena principal y, con frecuencia, no puede reemplazarse sin una distorsión estructural.

[0056] La sustitución conservativa de aminoácidos incluye una sustitución específica con base en la similitud de la cadena lateral (véase, por ejemplo, Lehninger, Biochemistry, 2ª edición revisada, publicada en 1975, págs. 73-75 (L. Lehninger, Bioquímica, 2ª edición, págs. 73-75, Worth Publisher, Nueva York (1975))), y una sustitución típica. Además, la sustitución conservativa de aminoácidos es de preferencia una sustitución de un aminoácido perteneciente al mismo grupo que un grupo de aminoácidos, agrupados según las propiedades de la cadena lateral comunes a las de los siguientes aminoácidos naturales.

[0057] Aminoácidos hidrófobos (también llamados no polares): aminoácidos que son hidrófobos (no polares) e incluyen alanina ("Ala" o simplemente "A"), glicina ("Gly" o simplemente "G"), valina ("Val" o simplemente "V"), leucina ("Leu" o simplemente "L"), isoleucina ("Ile" o simplemente "I"), prolina ("Pro" o simplemente "P"), fenilalanina ("Phe" o simplemente "F"), triptófano ("Trp" o simplemente "W"), tirosina ("Tyr" o simplemente "Y") y metionina ("Met" o simplemente "M").

[0058] Nótese que los aminoácidos hidrófobos pueden dividirse en los siguientes grupos:

[0059] Aminoácidos alifáticos: aminoácidos con ácido graso o hidrógeno en la cadena lateral, incluyendo Ala, Gly, Val, Ile y Leu.

Aminoácidos alifáticos/de cadena ramificada: aminoácidos con ácidos grasos ramificados en la cadena lateral, incluyendo Val, Ile y Leu.

Aminoácidos aromáticos: aminoácidos con un anillo aromático en la cadena lateral, incluyendo Trp, Tyr y Phe.

Aminoácidos hidrófilos (también llamados polares): aminoácidos que son hidrófilos (polares) e incluyen serina (también "Ser" o simplemente "S"), treonina (también "Thr" o simplemente "T"), cisteína (también "Cys" o simplemente "C"), asparagina (también "Asn" o simplemente "N"), glutamina (también "Gln" o simplemente "Q"), ácido aspártico (también "Asp" o simplemente "D"), ácido glutámico ("Glu" o simplemente "E") y lisina (también designada como "lisina"; "Lys" o simplemente "K"), arginina ("Arg" o simplemente "R") e histidina ("His" o simplemente "H").

[0060] Nótese que los aminoácidos hidrófilos pueden dividirse adicionalmente en los siguientes grupos:

[0061] Aminoácidos ácidos: aminoácidos con una cadena lateral ácida, incluyendo Asp y Glu.

Aminoácidos básicos: aminoácidos con una cadena lateral básica, incluyendo Lys, Arg y His.

Aminoácidos neutros: aminoácidos con una cadena lateral neutra, incluyendo Ser, Thr, Asn, Gln y Cys.

[0062] Gly y Pro pueden clasificarse también como "aminoácidos que afectan la dirección de la cadena principal", y los aminoácidos que contienen una molécula de azufre en la cadena lateral, es decir, Cys y Met, pueden clasificarse como "aminoácidos que contienen azufre".

[0063] Como se usa en la presente, el término "aminoácidos" incluye no sólo aminoácidos naturales, sino también aminoácidos no naturales. Entre los aminoácidos no naturales se incluyen los N-alquilaminoácidos, en los cuales el aminoácido natural descrito anteriormente es N-alquilado, y aquellos en los cuales el nitrógeno que forma un enlace peptídico es modificado con un grupo alquilo inferior, ramificado o no ramificado (por ejemplo, C1-C5, de preferencia C1-C3, más preferiblemente C1). Los N-alquilaminoácidos son de preferencia N-etilaminoácidos, N-butilaminoácidos o N-metilaminoácidos, y más preferiblemente N-metilaminoácidos. Además, entre los aminoácidos no naturales se incluyen los aminoácidos de la forma D (también llamados D-aminoácidos), β-aminoácidos, γ-aminoácidos, mutantes de aminoácidos, aminoácidos químicamente modificados, tales como sus derivados, y aminoácidos, como la norleucina y la ornitina, que no se usan como componentes básicos de proteínas *in vivo*. Además, se incluyen aminoácidos cuya cadena lateral de un aminoácido natural contiene además un grupo funcional, o es sustituida por otro grupo funcional (por ejemplo, aminoácidos con, por ejemplo, una porción de grupo arileno o alquileno en la cadena lateral con sustitución y/o adición, aminoácidos con un mayor número de átomos de carbono en un grupo arileno, alquileno o alquilo en la cadena lateral, aminoácidos con un anillo aromático sustituido en una cadena lateral, aminoácidos heterociclizados o ciclocondensados).

[0064] Nótese que la cadena lateral de un aminoácido natural puede contener o estar sustituida por una estructura tal como un grupo funcional. Esto puede conferirle una propiedad diferente a la de un aminoácido natural. Por ejemplo, Dap es un aminoácido que tiene un grupo amino en la cadena lateral de alanina. En este caso, el grupo amino se añade para exhibir una propiedad de aminoácido polar básico, que difiere de la alanina, que pertenece a un grupo de aminoácidos no polar. En otras palabras, los aminoácidos no naturales con propiedades de cadena lateral similares pueden incluirse en los grupos descritos anteriormente, obtenidos al clasificar los aminoácidos naturales con base en sus propiedades comunes de la cadena lateral. Por ejemplo, la N-metilarginina (MeR), un aminoácido en el cual el átomo de nitrógeno de la cadena principal de arginina, que pertenece a los aminoácidos básicos, es metilado, es un aminoácido no natural, pero es básico. Por lo tanto, puede clasificarse como un aminoácido básico. Como tal, los aminoácidos no naturales que exhiben propiedades de la cadena lateral similares a las de un cierto aminoácido, pueden incluirse también como objetivos para la sustitución conservativa de aminoácidos. Nótese que D-aminoácidos tales como de (ácido D-glutámico) pueden clasificarse como D-aminoácidos, o pueden clasificarse también de acuerdo con la propiedad de su cadena lateral. Los N-metilaminoácidos pueden clasificarse como N-alquilaminoácidos, o pueden clasificarse de acuerdo con la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido original que no es N-metilada.

[0065] Aunque no limitados, los aminoácidos no naturales incluyen N-metilaminoácidos, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, KMe, Hly, Hg, Orn, Dab, MeE, da, Aib, de, dkCOpipzaa, ddab, dor, MeW, W7N, W4C, Bph, 3Py6Ph, W6N, F41dMeCmm4Pyz, W1Bn, W6H, Bph4ms, W1Ph, W1aa, W7Ph3C, W1Ph4OMe, W1Ph4COO, W6H1Ph4COO, 3Py6NH2, Yph, F4CON, YBn, Yae, Nal1, F42Py, mBph, MeF, MeY, MeF3Me, MeF4CON, MeF3CON, F3CON, MeCha, MeYap, MeA1Ac4pip, MemBph, MeNal1, MeNal2, MeF4OMe, MeF4C, Eva, Cbg, Gcpe, TMe, MeG, Meda, dp, EtG, PrG, F3aa, F3aao, F4a, F4aao, F4C, F3OMe, F3COO, KAc, Bph2C, Bph2OMe, pBph2aao, F4COO, 3Py, 4Py, F4F, F4OMe, Cha, MeKMe, MeF4am, MeDap, MeF4COO, Ahp, Ano, Ado, Ade, Aoc, SPent, HseBu, AhpOMe, Aoc7r8dH, HsePr, AhpOH, Aun, MeK, MeKCOpipzaa, MeDab, MeF3Et, Me4Py, Me3Py, MeC, dc, Medc, dhcy, Hcy, Aeoac, Ape, dhgl, Hgl, MeHgl, Medhgl, MeAeoac, MeApe, pipzAc, pipAc, Pip4mAc, Pic4, F42Py y F44Py.

[0066] El péptido (A) sustituido en cualquiera de los 1 a 14 residuos de aminoácido, puede ser un péptido incluido en el alcance del péptido (B) descrito a continuación.

[0067] En una modalidad, el péptido de la presente invención es un péptido que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

A-R-W-Y-MeF-I-MeG-Y-Y-R-MeF-L-MeA-MeF-C (SEQ ID NO: 1),

o un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos que no contiene más de 14 sustituciones de aminoácido seleccionadas de las siguientes (1-i) a (1-xii):

[0068] (1-i) sustitución en donde la posición 1 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido o peptoide;

(1-ii) sustitución en donde la posición 2 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido;

(1-iii) sustitución en donde la posición 3 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

(1-iv) sustitución en donde la posición 4 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

(1-v) sustitución en donde la posición 5 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

(1-vi) sustitución en donde la posición 6 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral;

(1-vii) sustitución en donde la posición 7 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido secundario, N-alquil aminoácido o peptoide;

(1-viii) sustitución en donde la posición 8 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido;

(1-ix) sustitución en donde la posición 9 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que contiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

(1-x) sustitución en donde la posición 11 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que contiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

(1-xi) sustitución en donde la posición 12 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido alifático opcionalmente sustituido o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

(1-xii) sustitución en donde la posición 13 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido secundario, N-alquil aminoácido o peptoide;

(1-xiii) sustitución en donde la posición 14 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral; o

(1-xiv) sustitución en donde la posición 15 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 es reemplazada por cualquier aminoácido.

[0069] Aunque no limitado, el péptido de la presente invención puede ser un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene 14 o menos, 13 o menos, 12 o menos, 11 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos, o 1 sustitución de aminoácidos seleccionada de (1-i) a (1-xiv) anteriormente en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1. Las sustituciones (1-i) a (1-xii) incluyen cualquier combinación de las mismas.

[0070] La "sal farmacéuticamente aceptable del mismo" se refiere a una sal de cualquiera de los péptidos. Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales de ácidos minerales (por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico), sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido metansulfónico, ácido bencensulfónico), sales de aminas (por ejemplo, trimetilamina, metilamina) o sales de iones de metales (por ejemplo, iones de sodio, potasio o calcio). En el caso de compuestos que con el tiempo contienen humedad, dicha humedad se incluye también en la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0071] El péptido puede contener uno o más residuos de aminoácido adicionales además de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los "residuos de aminoácido adicionales" se describen en detalle en "3. Péptido (B)".

[0072] El péptido mencionado puede, en una modalidad, contener un enlazador, de preferencia en el extremo C-terminal. El "enlazador" se describe en detalle en "3. Péptido (B)".

[0073] El péptido mencionado es, en una modalidad, un péptido cíclico. El "péptido cíclico" se describe en detalle en "3. Péptido (B)".

[0074] El péptido mencionado anteriormente posee de preferencia actividad inhibidora de la miostatina. Los detalles de "que tiene actividad inhibidora de la miostatina" se describen en "3. Péptido (B)".

[0075] Los temas descritos en otras secciones se aplican también a esta sección, a menos que se indique de otra manera.

[0076] 3. Péptido (B)

La presente invención se refiere a un péptido o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las referencias aL “péptido” en la presente incluyen también referencias a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a menos que se indique de otra manera.

[0077] Los temas descritos en “2. Péptido (A)” se aplican también a esta sección, a menos que haya algún problema particular.

[0078] Una modalidad de la presente invención provee un péptido que incluye la siguiente secuencia de aminoácidos:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15 (SEQ ID NO: 2), en donde:

X1 es cualquier aminoácido o peptoide;

X2 es cualquier aminoácido;

X3 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X4 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X5 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral;

X7 es cualquier aminoácido secundario, N-alquilaminoácido o peptoide;

X8 es cualquier aminoácido;

X9 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X10 es R;

X11 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X12 es un aminoácido alifático opcionalmente sustituido o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

X13 es cualquier aminoácido secundario, N-alquilaminoácido o peptoide;

X14 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral; y

X15 es cualquier aminoácido.

[0079] (Péptido (B))

Una modalidad de la presente invención provee un péptido que satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos.

[0080] X1 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral o un peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral unida a un nitrógeno de amida;

X3 es F o W opcionalmente sustituido;

X4 es F o Y opcionalmente sustituido, o naftilalanina;

X5 es F, Y o naftilalanina opcionalmente sustituidos, o ciclohexilalanina opcionalmente sustituida;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo ramificado, o un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo, en donde un átomo de carbono contenido en el mismo es opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno;

X8 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X9 es F o Y opcionalmente sustituido, o un aminoácido que contiene un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral, o alanina;

X12 es un aminoácido alifático que contiene tres o más átomos de carbono en una cadena lateral, o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral;

X13 es un N-alquilaminoácido;

X14 es F o Y opcionalmente sustituido; y

X15 es un aminoácido que tiene un elemento de azufre (S) en el extremo de la cadena lateral.

[0081] (Péptido (B)-1)

Las opciones anteriores para X1 a X15 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Aunque no limitados, los requisitos incluyen 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, o 14 o más de los requisitos descritos anteriormente. De preferencia, se cumplen todos los 15 requisitos anteriores.

[0082] Una modalidad de la presente invención provee un péptido que satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos.

[0083] X1 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral o un peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral unida al nitrógeno de amida;

X3 es F o W opcionalmente sustituido;

X4 es F o Y opcionalmente sustituido, o naftilalanina;

X5 es F, Y o naftilalanina opcionalmente sustituidos, o ciclohexilalanina opcionalmente sustituida;

X6 es un aminoácido que tiene un grupo alquilo ramificado, o un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo, en donde un átomo de carbono contenido en el mismo es opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno;

X8 es un aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido o un grupo alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral;

X9 es F o Y opcionalmente sustituido, o un aminoácido que contiene un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral, o alanina;

X12 es un aminoácido alifático que contiene tres o más átomos de carbono en una cadena lateral, o un aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena

lateral;

X13 es un N-alquilaminoácido;

X14 es F o Y que tiene una cadena lateral opcionalmente sustituida; y

X15 es un aminoácido alifático, y está unido a un aminoácido alifático o prolina como X16.

[0084] (Péptido (B)-2)

Las opciones anteriores para X1 a X15 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Aunque no limitados, los requisitos incluyen 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, o 14 o más de los requisitos descritos anteriormente. De preferencia, se cumplen todos los 15 requisitos anteriores.

[0085] El péptido (B)-2 difiere del péptido (B)-1 en X15. En una modalidad, el péptido de la presente invención puede tener, pero no se limita a, hasta 15 o 16 residuos de aminoácido (cuando X16 está presente) en su estructura cíclica.

[0086] Ningún aminoácido es particularmente limitado, y puede ser cualquier aminoácido conocido. Nótese que ejemplos de cualquier aminoácido incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos de la forma L/D, N-alquilaminoácidos y peptoides.

[0087] Como se usa en la presente, el término "opcionalmente sustituido" significa no sustituido o sustituido con cualquier número de cualquier sustituyente.

[0088] Ejemplos del "aminoácido que tiene un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral" incluyen aminoácidos naturales pertenecientes a aminoácidos aromáticos, o aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos aromáticos N-acetilados, o aminoácidos naturales o no naturales con un anillo aromático añadido o sustituido en la cadena lateral del mismo, siempre que el anillo aromático del mismo pueda ser un heterociclo. Nótese que estos ejemplos incluyen un heterociclo en donde el anillo de indol de la cadena lateral de Trp tiene un anillo que contiene un heteroátomo, o un heterociclo en donde el grupo bencilo de la cadena lateral de Phe tiene un heteroátomo. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0089] El término "aminoácido con un anillo aromático sustituido" se refiere a un aminoácido en el cual un átomo de carbono que constituye el anillo aromático o un grupo funcional unido al anillo aromático es sustituido. El "anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral" puede ser uno con una estructura de anillo condensado (por ejemplo, un anillo de benceno, un anillo de indol, un anillo de naftaleno) en donde un átomo de carbono del mismo, por ejemplo, es reemplazado por otro átomo (por ejemplo, oxígeno, nitrógeno) y/o reemplazado por un átomo que tiene además otra molécula o grupo funcional. Nótese que puede contener un anillo heteroaromático. Además, ejemplos del aminoácido con un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral puede incluir un aminoácido en el cual un grupo hidroxilo de tirosina de la cadena lateral es reemplazado por otro

grupo funcional. El tipo y/o la posición del grupo funcional sustituido no son particularmente limitados, y puede seleccionarse opcionalmente, por ejemplo, de un grupo alquilo, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo, un grupo hidroxi o un halógeno. Ejemplos de aminoácidos con un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral incluyen la tirosina, el triptófano, la histidina o la fenilalanina. El aminoácido con un anillo aromático opcionalmente sustituido en una cadena lateral puede ser cualquier aminoácido natural o no natural, tal como 4Py, 3Py, F4aao, W7N, Bph, F44Py, F4F o F4C.

[0090] Ejemplos de la "naftilalanina opcionalmente sustituida" incluyen la naftilalanina y los aminoácidos en los cuales un átomo de carbono en el grupo naftilo de la cadena lateral de la naftilalanina es reemplazado por otro átomo, tal como nitrógeno, y/o es reemplazado por un átomo que tenga además otra molécula o grupo funcional. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0091] Ejemplos del "aminoácido que tiene un cicloalquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral" incluyen un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo (también llamado grupo alquilo cíclico) en una cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo de C_{3-8}. Además, ejemplos del "aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo sustituido" incluyen aquellos con una cadena lateral en la cual algunos átomos de carbono del grupo cicloalquilo son reemplazados por otros átomos tales como el oxígeno o el nitrógeno, o por átomos que tienen además otras moléculas o grupos funcionales. En otras palabras, ejemplos del "aminoácido que tiene un grupo cicloalquilo sustituido" incluyen aquellos con un grupo heterocicloalquilo. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0092] Ejemplos del "aminoácido que tiene un grupo heterocicloalquilo en una cadena lateral" incluyen un aminoácido con un anillo en el cual algunos átomos de carbono del grupo cicloalquilo mencionado anteriormente son reemplazados por otros átomos tales como oxígeno o nitrógeno, o por átomos que tienen además otras moléculas o grupos funcionales. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones. Además, ejemplos del "aminoácido que tiene un grupo heterocicloalquilo sustituido" incluyen un aminoácido con un heterociclo en la cadena lateral en el cual algunas moléculas en el grupo heterocicloalquilo son reemplazadas por otras moléculas o grupos funcionales. Ejemplos incluyen un aminoácido en el cual algunos átomos de carbono del grupo heterocicloalquilo son reemplazados con nitrógeno que contiene un grupo etilo (CH_3-CH_2-N). Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0093] El "aminoácido que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral" significa un aminoácido que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral, y los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, alanina, prolina, isoleucina, leucina y valina, siempre que el grupo alquilo pueda ser lineal o cíclico.

[0094] El término "aminoácido que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena

lateral" se refiere a un aminoácido que tiene un grupo alquilo tipo cadena en una cadena lateral. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, alanina, isoleucina, leucina o valina, en donde la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo alquilo tipo cadena en una cadena lateral es sustituida adicionalmente con un sustituyente, tal como un grupo alquilo o un grupo polar. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un grupo carboxi, un grupo amida o un grupo metansulfonilo. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0095] Ejemplos del "peptoide" incluyen un aminoácido cuya cadena lateral está unida al nitrógeno de amida contenido en el aminoácido. La cadena lateral no es particularmente especificada, y puede ser cualquier estructura de cadena lateral de aminoácido conocida.

[0096] El término "peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido en una cadena lateral unida al nitrógeno de amida" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral unida al nitrógeno de amida, en donde la cadena lateral del aminoácido que tiene un grupo alquilo tipo cadena es además sustituida con un sustituyente tal como un grupo alquilo o un grupo polar, ejemplos del cual incluyen, pero no están limitados a, un grupo carboxi, un grupo amida o un grupo metansulfonilo. Además, otros ejemplos del "peptoide que tiene un grupo alquilo opcionalmente sustituido unido al nitrógeno de amida" incluyen, pero no se limitan a, alanina o glicina que tiene un grupo alquilo de C_{1-6} unido al nitrógeno de amida. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0097] Ejemplos del "aminoácido alifático opcionalmente sustituido" incluyen aminoácidos clasificados como aminoácidos alifáticos y aminoácidos que tienen un grupo alquilo lineal o ramificado en una cadena lateral en la cual algunas moléculas del grupo alquilo lineal o ramificado, son reemplazadas por otras moléculas o grupos funcionales. Ejemplos incluyen un aminoácido en el cual el grupo metilo CH_3- en la cadena lateral de alanina es reemplazado con un grupo pentilo ($CH_3CH_2CH_2$-), y un aminoácido (por ejemplo, AhpOMe, Ado) en el cual un átomo de carbono en el grupo alquilo es reemplazado con oxígeno. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0098] El término "aminoácido que contiene un elemento de azufre (S) en el extremo de la cadena lateral" se refiere a un aminoácido que contiene un átomo de azufre en el extremo de la cadena lateral. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cisteína (Cys), cisteína N-alquilada y cisteína de la forma D. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, C, MeC, dc, Medc, dhcy o Hcy.

[0099] Ejemplos del "F opcionalmente sustituido", "Y opcionalmente sustituido" o "W opcionalmente sustituido" incluyen un aminoácido que contiene un sustituyente en el anillo de benceno de la cadena lateral de Phe, en el grupo fenol de la cadena lateral de Tyr, o en el anillo de indol de la cadena lateral de Trp, un aminoácido que tiene un anillo que contiene heteroátomos, o un aminoácido que tiene un grupo funcional unido al mismo. Ejemplos pueden incluir un aminoácido en el cual un átomo de carbono en el anillo de indol de Trp es reemplazado adicionalmente con nitrógeno, o un aminoácido que tiene un grupo bifenilo en la cadena lateral en el cual un átomo de carbono del anillo de benceno

de Phe es reemplazado adicionalmente con un átomo de carbono que tiene un anillo de benceno. Además, ejemplos incluyen un aminoácido en el cual un átomo de carbono en el grupo bifenilo es reemplazado adicionalmente con otro átomo o un átomo con otro grupo funcional, y un aminoácido en el cual el grupo hidroxilo en el grupo fenol de Tyr es reemplazado con otro átomo, tal como flúor, o un átomo con otro grupo funcional. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0100] El término "aminoácido que tiene un grupo alquilo ramificado o un grupo cicloalquilo, en donde un átomo de carbono contenido en el mismo es opcionalmente reemplazado por un átomo de oxígeno" se refiere a un aminoácido en el cual un átomo de carbono contenido en un grupo alquilo ramificado o un grupo cicloalquilo en una cadena lateral es reemplazado con un átomo de oxígeno. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, isoleucina o TMe. Nótese que puede permitirse una o más sustituciones.

[0101] Ejemplos del "aminoácido alifático que tiene 3 o más átomos de carbono en una cadena lateral o aminoácido que tiene una cadena de alquilo opcionalmente sustituida en una cadena lateral" incluyen aminoácidos clasificados como aminoácidos alifáticos y aminoácidos que tiene un grupo alquilo en una cadena lateral, siempre que el grupo alquilo en una cadena lateral contenga 3 o más átomos de carbono, y el átomo de carbono en el grupo alquilo de la cadena lateral sea reemplazado por oxígeno u otra molécula o grupo funcional. Algunos ejemplos incluyen Ahp, Ano, AhpOMe, Ado, HsePr, SPent o Leu.

[0102] La "alanina o glicina que tiene un grupo alquilo de C_{1-6} unido al nitrógeno de amida" se refiere a un aminoácido que tiene además un grupo alquilo de C_{1-6}, de preferencia un grupo alquilo de C_{1-3}, unido al nitrógeno de amida de la alanina o la glicina. Nótese que la alanina que tiene un grupo alquilo de C_1 unido al nitrógeno de amida se denomina también N-metilalanina.

[0103] Además, ejemplos del N-alquilaminoácido incluyen, para cada aminoácido o su derivado, un aminoácido que tiene un grupo N-alquilo unido al nitrógeno de amida. Ejemplos incluyen N-metilaminoácido.

[0104] (Una modalidad de péptido (B)-1)

Una modalidad de la presente invención provee un péptido que satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos.

[0105] X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl;

X2 es R, Dap, K, E, A, da, S, G, de, dkCOpipzaa, ddab o dorn;

X3 es W, W7N, F44Py, Bph, W6N, F41dMeCmm4Pyz, W1Bn, W6H, W1Ph, Bph4ms, W1aa, W7Ph3C, W1Ph4OMe, W1Ph4COO, F42Py o W6H1Ph4COO;

X4 es Y, 3Py6NH2, YBn, Yae, Nal1, Yph o mBph;

X5 es MeF, MeY, MeF3Me, F, MeCha, MeYap, MeA1Ac4pip, MemBph, MeNal1, MeNal2,

MeF4OMe o MeF4C;

X6 es I, Gcpe o TMe;

X7 es MeG, MeA, Meda, dp, EtG o PrG;

X8 es Y, F4COO, K, 4Py, F, F3aao, F3OMe, A4paa, KCOpipzaa, Bph2C, Bph2OMe o pBph2aao;

X9 es Y, F4COO, 3Py, 4Py, F4aao, F4CON, F3CON, F4F o F4OMe;

X11 es MeF, Me4Py, Me3Py, F, Cha, MeCha, MeK, MeKMe, MeF4am, MeD, MeE, MeF4COO o F4am;

X12 es L, Ahp, Ano, Ado, Ade, Aoc, SPent, HseBu, AhpOMe, HsePr o Aun;

X13 es MeA, MeE, MeKCOpipzaa, MeK, MeDap o MeDab;

X14 es MeF, MeF3Et, Me4Py, Me3Py o MemBph; y

X15 es C, MeC, dc, Medc, dhcy o Hcy.

[0106] (Una modalidad de péptido (B)-2)

El péptido (B)-2 difiere del péptido (B)-1 en X15. En una modalidad, el péptido de la presente invención puede tener hasta 15 o 16 residuos de aminoácido (cuando X16 está presente) en su estructura cíclica.

[0107] Las opciones anteriores para X1 a X15 en una de las modalidades anteriores pueden seleccionarse en cualquier combinación. Aunque no limitados, los requisitos incluyen 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, o 14 o más de los requisitos descritos anteriormente. De preferencia, se cumplen todos los 15 requisitos anteriores.

[0108] Una modalidad de la presente invención provee un péptido que satisface uno o dos o más de los siguientes requisitos.

[0109] Los requisitos son los siguientes: X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl o de;

X2 es R, Dap, K, E, A, da, S, G, de, dkCOpipzaa, ddab o dorn;

X3 es W, W7N, F44Py, Bph, W6N, F41dMeCmm4Pyz, W1Bn, W6H, W1Ph, Bph4ms, W1aa, W7Ph3C, W1Ph4OMe, F42Py, W1Ph4COO o W6H1Ph4COO;

X4 es Y, 3Py6NH2, YBn, Yae, Nal1, Yph o mBph;

X5 es MeF, MeY, MeF3Me, F, MeCha, MeYap, MeA1Ac4pip, MemBph, MeNal1, MeNal2, MeF4OMe o MeF4C;

X6 es I, Gcpe o TMe;

X7 es MeG, MeA, Meda, dp, EtG o PrG;

X8 es Y, F4COO, K, 4Py, F, F3aao, F3OMe, A4paa, KCOpipzaa, Bph2C, Bph2OMe o

pBph2aao;

X9 es Y, F4COO, 3Py, 4Py, F4aao, F4CON, F3CON, F4F o F4OMe;

X11 es MeF, Me4Py, Me3Py, F, Cha, MeCha, MeK, MeKMe, MeF4am, MeD, MeE, MeF4COO o F4am;

X12 es L, Ahp, Ano, Ado, Ade, Aoc, SPent, HseBu, AhpOMe, HsePr o Aun;

X13 es MeA, MeE, MeKCOpipzaa, MeK, MeDap o MeDab;

X14 es MeF, MeF3Et, Me4Py, Me3Py o MemBph; y

X15 es Aeoac, Ape, dhgl, Hgl, MeHgl, Medhgl, MeAeoac o MeApe, o X15 es G, da, A o de, y está unido a MeA, Meda, G, da, MeG, P o A como X16.

[0110] Una modalidad de la presente invención provee un péptido que satisface uno o dos de los siguientes requisitos.

[0111] X1 es A, MeA, Dap, ApG, CrpG, CmG, MeD, N, CrmG, MeopG, MeeG, AcapG, A4paa, KCOpipzaa, CeG, CrbG, K, KMe, Hly, E, Hgl, Orn, Dab, MeE, D o MeHgl; y

X15 es Aeoac, Ape, dhgl, Hgl, MeHgl, Medhgl, MeAeoac o MeApe, o X15 es G, da, A o de, y está unido a MeA, Meda, G, da, MeG, P o A como X16.

Los péptidos anteriores (péptido (A) y péptido (B)) pueden contener además Dap, de, A4paa, KCOpipzaa, pipzAc, pipAc o Pip4mAc en el extremo C-terminal.

[0112] El péptido mencionado es, en una modalidad, un péptido cíclico. Por "péptido cíclico" se entiende un péptido en el cual dos aminoácidos están unidos, y que es cíclico en su totalidad o en parte. Ejemplos del péptido mencionado anteriormente incluyen aquellos en los cuales los aminoácidos en un péptido forman una estructura de entrelazamiento, aquellos en los cuales la estructura cíclica se forma mediante la formación de un anillo de lactama o una reacción de macrociclización, o aquellos que tienen una estructura tipo péptido lazo. En otras palabras, el péptido cíclico puede tener una parte con estructura cíclica y una parte de cadena lineal.

[0113] Los péptidos tienen generalmente una estabilidad metabólica pobre *in vivo.* Su gran tamaño dificulta su penetración en la membrana celular. Para abordar estos problemas, se ha adoptado una técnica de ciclización de péptidos. Se ha sugerido que esta técnica aumenta la resistencia a las proteasas y, por lo tanto, aumenta su estabilidad metabólica y restringe los cambios conformacionales, aumentando de esta manera su rigidez y mejorando la permeabilidad de la membrana y la afinidad por una proteína objetivo.

[0114] En una modalidad, el péptido presenta una estructura cíclica en la cual un aminoácido cloroacetilado está unido a un residuo de cisteína incluido en el péptido. En una modalidad, el péptido presenta una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un residuo de cisteína en el péptido. En una modalidad, el péptido presenta una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1)

está unido a un residuo de cisteína en la posición 15 incluyendo en el péptido. En una modalidad, el péptido presenta una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal cloroacetilado (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un residuo de cisteína en la posición 15 incluyendo en el péptido. La "cloroacetilación" puede ser también una "acetilación con halógeno" usando otro halógeno. Además, la "acetilación" puede ser también una "acilación" con un grupo acilo distinto del grupo acetilo.

En esta especificación, algunos aminoácidos pueden ser modificados para la ciclización de un péptido. La presente invención abarca también aminoácidos que han sido parcialmente modificados como tales. Por ejemplo, como se describió anteriormente, puede añadirse un grupo cloroacetilo al aminoácido N-terminal, y unirlo a un residuo de cisteína en el péptido para formar un anillo. Dichos varios aminoácidos (naturales/no naturales) que contienen un grupo cloroacetilo se incluyen también en los aminoácidos de la presente.

[0115] Además, en una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1: X1) y un aminoácido C-terminal (residuo de aminoácido en la posición 15: X15 o aminoácido en la porción más C-terminal si se añade X16 o similares como residuo de aminoácido adicional) están unidos. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) está unido a un grupo carboxilo de un aminoácido en la posición 15 incluido en el péptido. Además, en una modalidad, se añade además un residuo de aminoácido adicional a un residuo de aminoácido en la posición 15, y una estructura cíclica puede ser formada en la cual un aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1) puede estar unido, por ejemplo, a un residuo de aminoácido en la posición 16 o 17 obtenido añadiendo uno o más residuos de aminoácido adicionales al residuo de aminoácido en la posición 15. En una modalidad, el péptido tiene una estructura cíclica en la cual un grupo amino de un residuo de aminoácido en la posición 1 incluido en el péptido está unido a un grupo carboxilo de un residuo de aminoácido en la posición 16.

[0116] En una modalidad, el péptido que tiene una estructura cíclica puede presentar una estructura de entrelazamiento adicional entre los residuos de aminoácido de dicha estructura. En una modalidad, se forma una estructura de entrelazamiento en la cual la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la estructura cíclica está unida a la cadena lateral de otro residuo de aminoácido de la misma estructura. Por ejemplo, a título enunciativo, un grupo amino en el extremo de la cadena lateral de K, a saber, un residuo de aminoácido en la estructura cíclica, puede unirse a un grupo carboxilo en el extremo de la cadena lateral de MeE, a saber, otro residuo de aminoácido en la misma estructura cíclica, para formar una estructura de entrelazamiento dentro de la estructura cíclica. Además, en una modalidad, se forma una estructura de entrelazamiento entre un residuo de aminoácido N-terminal (residuo de aminoácido en la posición 1: X1) o un residuo de aminoácido en la posición 2 (X2) o 3 (X3)

y un residuo de aminoácido en la posición 11 (X11) o 13 (X13). En el péptido mencionado anteriormente, con estructura cíclica y otra estructura de entrelazamiento, puede haber una o más estructuras de entrelazamiento. Por ejemplo, el péptido con estructura cíclica y otra estructura de entrelazamiento se denomina también péptido bicíclico.

[0117] En una modalidad, el péptido con una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional presenta una estructura de entrelazamiento en la cual una cadena lateral del residuo de aminoácido N-terminal (X1) y una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 11 (X11) están unidas. En otra modalidad, se forma una estructura de entrelazamiento en la cual una cadena lateral del residuo de aminoácido N-terminal (X1) está unida a una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 13 (X13). En otra modalidad, se forma una estructura de entrelazamiento en la cual una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 2 (X2) está unida a una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 11 (X11). En otra modalidad, se forma una estructura de entrelazamiento en la cual una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 3 (X3) está unida a una cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 11 (X11).

[0118] En una modalidad, el péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional puede ser: un péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral de uno de los aminoácidos incluyendo, pero no limitados a, E, D, MeE, CeG, CrpG, CrbG, K, KMe, Hly, Dap, Hgl, Orn o Dab, está unida a una cadena lateral de uno de los aminoácidos MeF4am, MeK, MeKMe, MeD, MeE, MeF4COO y F4am, o una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral de uno de los aminoácidos D, CeG, CrpG, Dap y E está unida a una cadena lateral de uno de los aminoácidos MeDab, MeDap y MeE; un péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral de uno de los aminoácidos ddab y dorn está unida a una cadena lateral del aminoácido MeD o MeE; o un péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral de W1aa está unida a una cadena lateral de MeK. Además, el péptido mencionado puede ser: un péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral de uno de los aminoácidos MeE, MeHgl, E y Hgl está unida a una cadena lateral de MeF4am; o un péptido que tiene una estructura cíclica con una estructura de entrelazamiento adicional en la cual una cadena lateral del aminoácido CrpG o CeG está unida a una cadena lateral de MeDap. Además, puede permitirse una combinación de los aminoácidos mencionados.

[0119] Ejemplos del péptido con una estructura de entrelazamiento dentro de la porción cíclica incluyen a SEQ ID NOs: 238-290, 326-329, 334-338, 348-354, 358-360, 362-366 y 368. Una modalidad de la presente invención incluye o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 238-290, 326-329, 334-338, 348-354, 358-360, 362-366 y 368.

[0120] En una modalidad, el péptido incluye o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 2-314 o 326-368. En una modalidad, el péptido es un péptido cíclico que incluye o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 2-314 o 326-368. El péptido es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 2-314 o 326-368, o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con 1 a 14 (de preferencia 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 2 o 1) sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácido. Nótese que para una secuencia con residuos de aminoácido añadidos, puede añadirse una secuencia con muchos más residuos de aminoácido (por ejemplo, 1 a 14), siempre que la porción añadida sea un enlazador. Además, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con las sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos de aminoácido es de preferencia aquel con actividad inhibidora de la miostatina.

[0121] En una modalidad, el péptido no incluye a SEQ ID NO: 3 ni SEQ ID NOs: 110-140. Las referencias a "SEQ ID NOs: 2-314" pueden referirse en la presente a "SEQ ID NOs: 2, 4-109 y 141-314", excluyendo a SEQ ID NOs: 3 y 110-140.

[0122] En una modalidad, el péptido incluye o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 326-354.

[0123] El péptido puede incluir además uno o más residuos de aminoácido adicionales. El péptido puede contener, sin limitación, uno o más residuos de aminoácido adicionales además de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 2-314 y 326-368.

[0124] Los "residuos de aminoácido adicionales" pueden incluirse en el péptido que forma la estructura cíclica, o bien pueden añadirse como un enlazador del péptido cíclico. El péptido y el número de enlaces de amida (número y longitud de aminoácidos) en la porción del péptido, no son ilimitados.

[0125] Además, puede añadirse también un enlazador adicional al péptido cíclico. Ejemplos del enlazador incluyen el enlazador de aminoácidos (enlazador de péptidos) descrito anteriormente, un enlazador químico, un enlazador de ácidos grasos, un enlazador de ácidos nucleicos, o un enlazador de cadena de azúcar. El enlazador puede ser también un complejo, por ejemplo, de un enlazador químico y un enlazador de péptidos. El enlazador químico puede ser, por ejemplo, un enlazador de PEG que consiste en 1 a 24 unidades de etilenglicol. El enlazador puede ser también un enlazador de ácidos grasos que contenga una porción química divalente derivada de un ácido graso. El enlazador de aminoácidos (péptido) puede contener por lo menos un aminoácido. Es posible usar, por ejemplo, un péptido rico en glicina, tal como un péptido con la secuencia $[Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser]_n$ (en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6) como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 7,271,149, o un enlazador de péptidos rico en serina descrito en la patente de los Estados Unidos No. 5,525,491. Además, es posible usar, sin limitación, un enlazador de péptidos que contenga la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 315-325. Nótese que, en el enlazador de péptidos, el enlace

entre aminoácidos o entre un aminoácido y un enlazador químico puede realizarse a través de la cadena lateral del aminoácido. Puede añadirse un enlazador sin limitación para modificar las propiedades físicas (por ejemplo, la solubilidad) del péptido.

[0126] El enlazador puede añadirse en cualquier posición. Por ejemplo, puede estar unido a un aminoácido localizado en el lado C-terminal, o a un aminoácido contenido en un péptido cíclico. En una modalidad, el péptido mencionado contiene un enlazador en el extremo C-terminal. De preferencia, está unido a la Cys localizada en el extremo C-terminal, o a la cadena lateral de un aminoácido contenido en un péptido cíclico.

[0127] Además, el péptido puede formar un multímero mediante, por ejemplo, un enlazador. El número de péptidos en el multímero no es ilimitado. En una modalidad, el multímero es un dímero, trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, octámero o más. El multímero puede contener múltiples copias del mismo péptido o de múltiples péptidos diferentes.

[0128] En una modalidad, el péptido anterior tiene de preferencia actividad inhibidora de la miostatina.

[0129] En una modalidad, el péptido anterior tiene de preferencia actividad inhibidora de GDF-8.

[0130] La miostatina, llamada también GDF-8 (factor de diferenciación del crecimiento-8), es una proteína y un miembro de la superfamilia del TGF-β (factor de crecimiento transformante-β).

[0131] El término "miostatina", como se usa en la presente, se refiere a la miostatina de tipo natural que poseen los mamíferos, de preferencia roedores tales como los ratones y primates tales como los humanos, a menos que se especifique de otra manera.

Nótese que el término "miostatina humana" se refiere a la miostatina de tipo natural presente en los humanos (por ejemplo, ID del gen: 2660). A propósito, se sabe que las secuencias de aminoácidos de la miostatina humana, de ratón y de rata, son prácticamente idénticas.

A menos que se especifique de otra manera, en la presente, los términos "miostatina" y "miostatina humana" incluyen la miostatina sin procesar, la miostatina procesada, y sus mutantes. Se sabe también que la miostatina es glicosilada y dimerizada, y la miostatina activa (llamada también miostatina madura) es un homodímero que consiste en dos dominios del factor de crecimiento C-terminal, que están unidos por disulfuro.

[0132] La inhibición de la miostatina se refiere a la inhibición, prevención, antagonismo o inhibición competitiva de la señalización de la miostatina. La señalización de la miostatina se refiere a la señalización intracelular en la cual la miostatina se une al receptor de activina tipo II (ActRII: ID del gen: 92), causando la formación de un complejo con el receptor de activina tipo I (ActRI: ID del gen: 90). Es decir, la inhibición de la señalización de la miostatina incluye, por ejemplo, la inhibición de la unión de la miostatina a ActRII mediante la unión de un péptido a la miostatina o a ActRII; la inhibición de la formación de un complejo de ActRI-ActRII mediante la unión a ActR1; y la inhibición de una vía

de señalización del complejo de ActRI-ActRII, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de una vía de señalización mediada por Smad, PI3K, Ras o TAK1. Nótese que la inhibición de una vía de señalización significa la reducción, modulación o inhibición de cualquiera de las señales.

[0133] La "actividad inhibidora de la miostatina" puede evaluarse usando métodos conocidos. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos de la presente, la actividad puede evaluarse mediante un sistema para medir una actividad inhibidora de la miostatina *in vitro* mediante el uso de un gen reportero, o midiendo el peso corporal y la fuerza muscular de ratones. En forma alternativa, la actividad inhibidora de la miostatina puede evaluarse mediante los métodos descritos, por ejemplo, en los documentos JP-A-2020-011965 y JP-A-2022-101593.

[0134] Aunque no limitada, la actividad inhibidora de la miostatina puede expresarse como IC50, por ejemplo, en un sistema para medir una actividad inhibidora de la miostatina *in vitro* mientras se usa un gen reportero.

[0135] En una modalidad, el péptido es selectivo (específico) de la miostatina. Además, de preferencia, presenta una baja actividad inhibidora de la actividad del GDF-11.

[0136] Se sabe que muchas moléculas con actividad inhibidora de la miostatina inhiben no sólo la actividad de la miostatina (GDF-8), sino también la actividad del GDF-11, que pertenece a la misma superfamilia del TGF-β. Las secuencias de aminoácidos de la miostatina activa y del GDF-11 mencionadas anteriormente presentan una alta identidad; y además, la miostatina, el GDF-11 y la activina son transductores de señales mediados por ActR. Por lo tanto, moléculas tales como los anticuerpos con actividad inhibidora de la miostatina inhiben con frecuencia la actividad de los tres factores de crecimiento: miostatina, GDF-11 y activina. Sin embargo, de preferencia, no debe inhibirse el GDF-11, especialmente en niños y adultos jóvenes, debido a sus efectos mejoradores de la función muscular como factor rejuvenecedor. En una modalidad, se prefiere un inhibidor de la miostatina que inhiba específicamente sólo a la miostatina y no otros transductores de señales de la miostatina (por ejemplo, el GDF-11) distintos de la miostatina. Nótese que el GDF-11 presenta también una alta homología entre ratones, humanos y ratas. Las referencias al "GDF-11" en la presente se refieren de preferencia al GDF-11 humano (ID del gen: 10220).

[0137] Nótese que la frase "no inhibe al GDF-11" significa que la actividad inhibidora contra la señalización del GDF-11 es menor que contra la señalización de la miostatina. Por ejemplo, significa que la IC50 para el GDF-11 es 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200 o más veces mayor que la IC50 para la miostatina en el sistema para medir una actividad inhibidora de la miostatina *in vitro* mientras se usa un gen reportero.

[0138] En una modalidad, el péptido de la presente invención posee actividad inhibidora contra la miostatina derivada de múltiples especies. De preferencia, dicho péptido posee actividad inhibidora contra la miostatina de origen humano.

[0139] La presente invención provee un péptido novedoso con actividad inhibidora de la miostatina. De preferencia, este péptido no inhibe al GDF-11 en comparación con la actividad inhibidora de la miostatina. Esto se ha demostrado, por ejemplo, en los ejemplos 3 y 4 de la presente, lo que sugiere que, si bien el péptido tiene actividad inhibidora contra la miostatina, esta es mucho menor contra el GDF-11 que contra la miostatina.

[0140] El péptido con actividad inhibidora de la miostatina es eficaz en el tratamiento y la prevención de varias enfermedades mediadas por el BMP. Este péptido ha demostrado ser eficaz en varios experimentos sobre varias enfermedades mediadas por la miostatina.

[0141] Como se usa en la presente, el término "péptido" incluye tanto a "2. Péptido (A)" como a "3. Péptido (B)", a menos que se indique de otra manera.

[0142] Los temas descritos en otras secciones se aplican también a esta sección, a menos que se indique de otra manera.

[0143] 4. Producción del péptido

El péptido de la presente invención puede producirse mediante cualquier método conocido de producción de péptidos. Algunos ejemplos son los siguientes:

[0144] Los temas descritos en otras secciones se aplican también a esta sección, a menos que se indique de otra manera.

[0145] Se usan en la presente un método de síntesis química tal como un método en fase líquida, un método en fase sólida, un método híbrido en el cual se combinan métodos en fase líquida y en fase sólida; y un método genético recombinante.

[0146] En el método en fase sólida, por ejemplo, el grupo hidroxilo de una resina hidroxilada es esterificado con el grupo carboxi del primer aminoácido, grupo α-amino cuyo grupo amino es protegido por un grupo protector (generalmente el aminoácido C-terminal del péptido de interés). El catalizador de esterificación usado puede ser un agente de deshidratación-condensación conocido, tal como 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), diciclohexilcarbodiimida (DCC) o diisopropilcarbodiimida (DIC).

[0147] Después, el grupo protector del grupo alfa-amino del primer aminoácido es eliminado, y se añade un segundo aminoácido, en el cual todos los grupos funcionales, salvo el grupo carboxi de la cadena principal, son protegidos, para activar dicho grupo, y se acoplan los aminoácidos primero y segundo. Además, se desprotege al grupo alfa-amino del segundo aminoácido, y se añade un tercer aminoácido, en el cual todos los grupos funcionales, salvo el grupo carboxi de la cadena principal, son protegidos, para activar dicho grupo, y se acoplan los aminoácidos segundo y tercero. Este procedimiento se repite hasta sintetizar un péptido de la longitud deseada, momento en el cual se desprotege a todos los grupos funcionales.

[0148] Ejemplos de la resina para la síntesis en fase sólida incluyen la resina Merrifield, la resina

MBHA, la resina Cl-Trt, la resina SASRIN, la resina de Wang, la resina de amida de Rink, la resina HMFS, la resina Amino-PEGA (Merck) o la resina HMPA-PEGA (Merck). Estas resinas pueden lavarse con un solvente (por ejemplo, dimetilformamida [DMF], 2-propanol, cloruro de metileno) antes de su uso.

[0149] Ejemplos del grupo protector para el grupo alfa-amino incluyen un grupo benciloxicarbonilo (Cbz o Z), un grupo ter-butoxicarbonilo (Boc), un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), un grupo bencilo, un grupo alilo o un grupo aliloxicarbonilo (Alloc). El grupo Cbz puede ser desprotegido, por ejemplo, con ácido fluorhídrico o mediante hidrogenación; el grupo Boc, con ácido trifluoroacético (TFA); y el grupo Fmoc, mediante tratamiento con piperidina o pirrolidina.

[0150] El grupo α-carboxi puede ser protegido usando, por ejemplo, éster metílico, éster etílico, éster alílico, éster bencílico, éster ter-butílico o éster ciclohexílico.

[0151] El grupo carboxi puede ser activado usando un agente de condensación. Ejemplos del agente de condensación incluyen la diciclohexilcarbodiimida (DCC), la diisopropilcarbodiimida (DIC), la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC o WSC), el hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o el hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metil]-1H-benzotriazolio (HBTU).

[0152] La cadena peptídica puede ser escindida de la resina mediante tratamiento con un ácido tal como TFA o fluoruro de hidrógeno (HF).

[0153] El péptido puede producirse usando un método de recombinación genética (sistema de traducción-síntesis) usando un ácido nucleico que codifica para el péptido descrito anteriormente. El ácido nucleico que codifica para el péptido puede ser ADN o ARN.

[0154] El ácido nucleico que codifica para el péptido puede prepararse mediante un método conocido o equivalente. Por ejemplo, el ácido nucleico puede sintetizarse con un sintetizador automático. El ADN resultante puede contener uno o más sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para la inserción del vector. En forma alternativa, puede incorporarse una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos, de modo que la cadena peptídica resultante pueda ser cortada usando enzimas u otros medios.

[0155] Para inhibir la degradación por proteasas derivadas del hospedero, puede usarse también un método de expresión de proteínas quiméricas, en donde un péptido objetivo es expresado como un péptido quimérico con otro péptido. En este caso, es posible usar, como el ácido nucleico mencionado, un ácido nucleico que codifica para el péptido objetivo y un péptido fusionado al péptido objetivo.

[0156] Entonces, se prepara un vector de expresión usando el ácido nucleico que codifica para los péptidos. El ácido nucleico puede ser insertado hacia el extremo 3' del promotor del vector de expresión, ya sea tal cual, mediante digestión con enzimas de restricción o añadiendo un enlazador. Ejemplos del vector incluyen: un plásmido derivado de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pBluescript II); un plásmido derivado de *Bacillus subtilis* (por ejemplo,

pUB110, pTP5, pC1912, pTP4, pE194, pC194); un plásmido derivado de levadura (por ejemplo, pSH19, pSH15, YEp, YRp, YIp, YAC); un bacteriófago (por ejemplo, fago e, fago M13); un virus (por ejemplo, retrovirus, virus de la vaccinia, adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, baculovirus); o un cósmido.

[0157] El promotor puede seleccionarse, si procede, según el tipo de hospedero. Si el hospedero es una célula animal, por ejemplo, puede usarse un promotor derivado de SV40 (virus simiano 40) o de CMV (citomegalovirus). Si el hospedero es *E. coli*, puede usarse, por ejemplo, el promotor trp, el promotor T7 o el promotor lac.

[0158] El vector de expresión puede tener, por ejemplo, un origen de replicación de ADN (ori), un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos, requerimiento de nutrientes), un intensificador, una señal de empalme, una señal de adición de poli-A y/o un ácido nucleico que codifica para un marcador (por ejemplo, FLAG, HA, GST, GFP).

[0159] Después, una célula hospedera adecuada es transfectada con el vector de expresión. El hospedero puede seleccionarse, si procede, en función de su relación con el vector. Ejemplos del hospedero usado incluyen: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, una bacteria del género *Bacillus*, una levadura, un insecto o célula de insecto, o una célula animal. Ejemplos de la célula animal usada incluyen las células HEK293T, las células CHO, las células COS, las células de mieloma, las células HeLa o las células Vero. La transfección puede llevarse a cabo, de acuerdo con el tipo de hospedero, mediante un método conocido tal como lipofección, un método que usa fosfato de calcio, electroporación, microinyección, pistola de partículas u otros métodos conocidos. Los transformantes pueden cultivarse según un procedimiento de rutina para expresar un péptido de interés.

[0160] El péptido puede purificarse del cultivo transformante mediante la recolección de las células cultivadas, su suspensión en una solución de regulador de pH adecuada, por ejemplo, mediante sonicación o congelación-descongelación para destruir las células, y posteriormente mediante centrifugación o filtración para obtener un extracto crudo. Si el péptido es secretado al medio de cultivo, se recolecta el sobrenadante.

[0161] La purificación del extracto crudo o sobrenadante del cultivo puede realizarse también mediante un método conocido o un método equivalente (por ejemplo, cloración, diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase invertida).

[0162] Puede usarse un método conocido o un método equivalente para convertir el péptido resultante en forma libre hasta una sal, o el péptido en forma de sal hasta una forma libre.

[0163] En una modalidad, el sistema de síntesis de traducción puede ser un sistema de traducción libre de células. El sistema de traducción libre de células permite obtener generalmente un producto expresado en una forma altamente pura sin purificación. El sistema de traducción libre de células

contiene, por ejemplo, proteínas ribosomales, aminoacil-ARNt sintetasa (ARS), ARN ribosomal, aminoácidos, ARNr, GTP, ATP, factor de iniciación de la traducción (IF), factor de elongación (EF), factor de terminación (RF) y factor de regeneración ribosomal (RRF), así como otros factores necesarios para la traducción. Puede añadirse extracto de *E. coli* o extracto de germen de trigo para aumentar la eficiencia de la expresión. Además, puede añadirse también extracto de glóbulos rojos de conejo o de células de insecto.

[0164] Puede suministrarse energía de forma continua al sistema que los contiene mediante diálisis para producir, de una manera no limitativa, varios cientos de μg a varios mg/mL de la proteína. El sistema puede incluir también ARN polimerasa para la transcripción a partir del ADN del gen. Como sistemas de traducción libres de células disponibles comercialmente, pueden usarse ejemplos de sistemas derivados de *E. coli* como el RTS-100 de Roche Diagnostics (marca registrada), el PURESYSTEM de Gene Frontier o el kit de síntesis de proteínas *in vitro* PURExpress de NEW ENGLAND Biolabs; y ejemplos de sistemas que usan extracto de germen de trigo como los de ZOEGENE Corporation y CellFree Sciences Co., Ltd.

[0165] En el sistema de traducción celular, en lugar del aminoacil-ARNt sintetizado por la aminoacil-ARNt sintetasa natural, puede usarse un aminoacil-ARNt artificial en el cual el aminoácido o hidroxiácido deseado es unido (acilado) al ARNt. Este aminoacil-ARNt puede sintetizarse usando una ribozima artificial.

[0166] Ejemplos de dicha ribozima incluyen flexizima (véase H. Murakami, H. Saito y H. Suga, (2003), Chemistry & Biology, Vol. 10, 655-662; y el documento WO2007/066627 u otros). La flexizima se conoce también como y se denomina la flexizima original (Fx) o una forma modificada tal como dinitrobencilflexizima (dFx), flexizima mejorada (eFx) o aminoflexizima (aFx).

[0167] Al usar el ARNt generado por la flexizima, al que se une el aminoácido o hidroxiácido deseado, puede asociarse el codón deseado con dicho aminoácido o hidroxiácido para su traducción. Puede usarse un aminoácido específico como el aminoácido deseado. Por ejemplo, el aminoácido no natural necesario para la ciclización descrita anteriormente puede introducirse también en el péptido unido mediante este método.

[0168] El péptido puede sintetizarse químicamente usando varios métodos habituales en la técnica. Algunos ejemplos incluyen la síntesis en fase sólida por etapas, la semi-síntesis de un fragmento peptídico mediante religación asistida por conformación, o la ligación química. La síntesis del péptido es una síntesis química que usa varias técnicas en fase sólida, como se describe, por ejemplo, en K. J. Jensen, P. T. Shelton y S. L. Pedersen, Peptide Synthesis and Applications, 2ª edición, Springer, 2013. La estrategia preferida se basa en la combinación de un grupo Fmoc que protege temporalmente al grupo α-amino, y permite la remoción selectiva por una base, y un grupo protector que protege temporalmente al grupo funcional de la cadena lateral y es estable bajo condiciones de Fmoc. Dicha

selección general de la cadena lateral del péptido se describe en la anterior Peptide Synthesis and Applications, 2ª edición, y G. B. Fields, R. L. Noble, Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 1990, 161-214. Ejemplos del grupo protector de la cadena lateral del péptido preferido incluyen: un grupo bencilo, ter-butilo o tritilo (Trt) para el grupo hidroxi de la serina o treonina; un grupo 2-bromobenciloxicarbonilo o ter-butilo para el grupo hidroxi de la tirosina; un grupo Boc, metiltetrazol tiol (Mtt), Alloc o ivDde para el grupo amino de la cadena lateral de lisina; un grupo Trt o Boc para el grupo imidazol de histidina; un grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para el grupo guanidilo de arginina; un grupo ter-butilo, alilo o 3-metilpentano (Mpe) para el grupo carboxilo de, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; un grupo Trt para el grupo carboxamida de glutamina o asparagina; o un grupo Trt o monometoxitritilo (Mmt) para el grupo tiol de cisteína.

[0169] El péptido puede sintetizarse de forma gradual en la resina de fase sólida descrita anteriormente. Los grupos protectores de alfa-amino del aminoácido C-terminal usado, así como todos los aminoácidos y el péptido usados en la síntesis, deben removerse selectivamente durante el procedimiento de síntesis. De preferencia, se usa la resina en fase sólida descrita anteriormente para iniciar el procedimiento. El grupo carboxilo C-terminal del péptido con el extremo N-terminal protegido adecuadamente con un grupo Fmoc o similares, o el grupo carboxilo C-terminal de un aminoácido protegido con un grupo Fmoc, se transforma en un éster activado con un reactivo apropiado, y entonces se acopla al grupo amino en la resina en fase sólida. La elongación posterior de la cadena peptídica puede lograrse repitiendo secuencialmente la remoción del grupo protector N-terminal (grupo Fmoc), seguida de la condensación con un derivado de aminoácido protegido, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos del péptido de interés. Nótese que el péptido de interés puede liberarse en la etapa final. Por ejemplo, como condiciones de liberación, puede usarse para la liberación una solución de TFA que contenga agua/hidruro de sililo/tiol como depurador en TFA, como se describe, por ejemplo, en Teixeira, W. E. Benckhuijsen, P. E. de Koning, A. R. P. M. Valentijn, J. W. Drijfhout, Protein Pept. Lett. 2002, 9, 379-385. Un ejemplo típico es TFA/Agua/TIS/DODT (relación de volumen: 92.5:2.5:2.5:2.5).

[0170] El péptido descrito en la presente puede sintetizarse usando un sintetizador de péptidos de un sólo canal o de múltiples canales, tal como el sintetizador Liberty Blue de CEM o el sintetizador Syro I de Biotage o sus sucesores.

[0171] El grupo carboxi puede ser activado usando un agente de condensación. Ejemplos del agente de condensación incluyen la diciclohexilcarbodiimida (DCC), la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC o WSC), el hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) o el hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metil]-1H-benzotriazolio (HBTU).

[0172] El péptido puede ser ciclizado conforme a un procedimiento conocido. Aunque no limitado, por ejemplo, el péptido puede diseñarse para que contenga dos o más residuos de cisteína, de modo que pueda formarse una estructura cíclica a través de un enlace disulfuro después de la traducción. Además, puede usarse el método de Goto (Y. Goto, *et al.*, ACS Chem. Biol., 3, 120-129 (2008)) para sintetizar un péptido que tiene un grupo cloroacetilo en el extremo N-terminal mediante una técnica de reprogramación del código genético. En el péptido, puede colocarse un residuo de cisteína que contiene una molécula de azufre para su ciclización. Esto ocasiona el ataque nucleofílico espontáneo del grupo mercapto sobre el grupo cloroacetilo después de la traducción, y el péptido es ciclizado a través de un enlace tioéter. Otra combinación de aminoácidos que son unidos para formar un anillo puede colocarse, para su ciclización, dentro del péptido mediante una técnica de reprogramación del código genético. En forma alternativa, el péptido puede ciclizarse colocando un residuo de ácido L-2-amino adípico en el péptido, y uniéndolo al grupo amino de la cadena principal N-terminal. De esta manera, cualquier método de ciclización conocido puede usarse sin restricciones.

[0173] El péptido puede adoptar además una estructura bicíclica en la cual se forma un entrelazamiento dentro del anillo. La formación de la estructura bicíclica puede realizarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, aunque no limitado, un péptido con una estructura bicíclica puede obtenerse uniendo dos cadenas laterales de aminoácidos en una estructura cíclica, con o sin otros aminoácidos o similares.

[0174] 5. Composición, etc.

La presente invención se refiere a una composición que contiene un péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición no es limitada, y puede ser una composición farmacéutica (una composición para uso médico), una composición de diagnóstico o una composición terapéutica.

[0175] Los temas descritos en otras secciones se aplican también a esta sección, a menos que se indique de otra manera.

[0176] <u>Composición farmacéutica</u>

En una modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene el péptido mencionado anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La enfermedad objetivo de la composición farmacéutica no se limita particularmente a alguna enfermedad, si el péptido mencionado anteriormente es eficaz.

En una modalidad, la composición farmacéutica anterior tiene actividad inhibidora de la miostatina.

[0177] En una modalidad, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina, o una enfermedad o síntoma asociado

con una función muscular reducida.

[0178] El término "enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida" incluye enfermedades conocidas relacionadas con la miostatina o enfermedades o síntomas asociados con una función muscular reducida. Por ejemplo, las enfermedades incluyen, sin limitación, enfermedades originadas en el tejido muscular, tales como la miopatía y la atrofia muscular miogénica, así como enfermedades originadas en el sistema nervioso, tales como la atrofia muscular neurogénica.

[0179] En una modalidad, el término "enfermedades relacionadas con la miostatina" incluye distrofias musculares (incluyendo la distrofia muscular de Duchenne [DMD], distrofia muscular facioescapulohumeral [FSHD], distrofia muscular de cinturas (LGMD), distrofia muscular de Becker (BMD) y similares), miopatías (incluyendo la miopatía congénita, la miopatía inflamatoria, la miopatía metabólica, la miopatía mitocondrial, la miopatía endocrina, la miopatía miofibrilar, la miopatía distal y similares), atrofia muscular neurogénica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular, atrofia muscular espinal (SMA), y similares.

[0180] En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención previene la disminución de la cantidad de fibras musculares. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención aumenta la cantidad de fibras musculares. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención aumenta la fuerza de las fibras musculares. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención suprime la necrosis de las fibras musculares. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención suprime la fibrosis y la formación de tejido adiposo secundaria a la necrosis de las fibras musculares. Sin limitación, la "enfermedad o síntoma asociado con la función muscular reducida" incluye la disminución de la cantidad de fibras musculares, la necrosis de las fibras musculares y la fibrosis y la formación de tejido adiposo secundaria a la necrosis de las fibras musculares.

[0181] En una modalidad, la composición farmacéutica se administra a un individuo que tiene una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una reducción de la función muscular. El "individuo" es de preferencia un humano.

[0182] La composición farmacéutica puede contener el péptido mismo y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo. Como se usa en la presente, el término "péptido" puede incluir una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo, a menos que se especifique de otra manera. La composición farmacéutica contiene de preferencia una cantidad efectiva del péptido como ingrediente activo.

[0183] La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente no es particularmente limitada, y puede administrarse por vía oral o parenteral. Ejemplos de la administración parenteral incluyen una inyección (por ejemplo, una inyección intramuscular,

intravenosa o subcutánea) o una administración transdérmica o transmucosa (nasal, oral, ocular, transpulmonar, transvaginal o rectal).

[0184] La composición farmacéutica puede modificarse de varias maneras en vista de las características de fácil metabolización o excreción del péptido. Por ejemplo, puede añadirse polietilenglicol (PEG) o una cadena de azúcar al polipéptido para aumentar el tiempo de residencia en la sangre y disminuir la antigenicidad. Además, puede usarse un compuesto polimérico biodegradable (por ejemplo, glicol de ácido poliláctico (PLGA)), hidroxiapatita porosa, liposomas, liposomas de superficie modificada, una emulsión preparada con ácidos grasos insaturados, nanopartículas o nanoesferas como material base de liberación sostenida, y el polipéptido puede encapsularse en ellos. Para la administración transdérmica, puede aplicarse una corriente eléctrica débil a la superficie de la piel para la permeación del estrato córneo (método de iontoforesis).

[0185] La composición farmacéutica puede obtenerse en una preparación usando el ingrediente activo tal cual, o añadiendo un vehículo, excipiente y/o aditivo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de la forma de dosificación incluyen líquidos (por ejemplo, inyecciones), dispersiones, suspensiones, tabletas, cartuchos, polvos, supositorios, polvos, partículas finas, gránulos, cápsulas, jarabes, pastillas, inhalantes, ungüentos, colirios, gotas nasales, gotas óticas o cataplasmas. La preparación puede lograrse mediante un procedimiento común usando, por ejemplo, un excipiente, un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un solvente, un coadyuvante de disolución, un colorante o un corrector de olores, un estabilizador, un emulsionante, un intensificador de la absorción, un agente tensoactivo, un modificador de pH, un conservador y/o un antioxidante, según corresponda.

[0186] Ejemplos del componente usado en la preparación incluyen, pero no se limitan a, agua purificada, solución salina, regulador de pH de fosfato, dextrosa, glicerol, etanol u otros solventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, aceite animal o vegetal, lactosa, manitol, glucosa, sorbitol, celulosa cristalina, hidroxipropilcelulosa, almidón, almidón de maíz, anhídrido silícico, silicato de magnesio y aluminio, colágena, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilato de sodio, alginato de sodio, dextrán soluble en agua, carboximetil almidón de sodio, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantano, goma arábiga, tragacanto, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, miristato de octildodecilo, miristato de isopropilo, alcoholes superiores, alcohol estearílico, ácido esteárico o albúmina de suero humano.

[0187] Dado que los péptidos suelen ser difíciles de absorber por vía transmucosa, la composición farmacéutica puede contener un intensificador de la absorción para mejorar la absorción de un fármaco poco absorbible. Ejemplos de dicho intensificador de la absorción incluyen: un agente tensoactivo (por ejemplo, un compuesto de éter laurílico de polioxietileno, lauril sulfato de sodio, saponina); una sal de ácido biliar (por ejemplo, ácido glicólico, ácido desoxicólico, ácido taurocólico);

un quelante (por ejemplo, EDTA, ácido salicílico); un compuesto de ácido graso (por ejemplo, ácido caproico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido oleico, ácido linoleico, una micela mixta); o un derivado de enamina, un péptido de N-acil colágena, un N-acilaminoácido, un compuesto de ciclodextrina, un compuesto de quitosán o un donador de óxido nítrico.

[0188] Si la composición farmacéutica es un cartucho o una tableta, puede estar recubierta con una capa de azúcar o una sustancia soluble en el estómago o en el intestino.

[0189] Si la composición farmacéutica es inyectable, puede contener agua destilada para inyección, solución salina fisiológica, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y/o un compuesto alcohólico. Además, puede añadirse un agente humectante, un emulsionante, un dispersante, un estabilizador, un agente de disolución, un auxiliar de disolución y/o un conservador.

[0190] La composición farmacéutica puede estar dirigida no sólo a los humanos sino también a mamíferos no humanos o aves. Ejemplos de los mamíferos no humanos incluyen los primates no humanos (por ejemplo, monos, chimpancés, gorilas), los animales domésticos (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, ovejas), o los perros, gatos, ratas, ratones, conejillos de Indias o conejos.

[0191] En particular, la dosis administrada a un humano varía según los síntomas, la edad, el sexo, el peso y la sensibilidad del paciente, así como el método de administración, el intervalo de administración, el tipo de ingrediente activo y el tipo de preparación. La dosis no es limitada, y la dosis de, por ejemplo, 30 μg a 100 g, de 100 μg a 500 mg o de 100 μg a 100 mg puede administrarse en una o varias dosis separadas. Para inyección, 1 μg/kg a 3000 μg/kg o 3 μg/kg a 1000 μg/kg puede administrarse una vez o en varias dosis separadas, dependiendo del peso corporal del paciente.

[0192] En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida, el método incluyendo la administración de un péptido de la presente invención.

[0193] En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0194] En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención en la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0195] En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0196] En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención, el péptido teniendo actividad inhibidora de la miostatina.

[0197] En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención para su uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0198] En una modalidad, la presente invención se refiere a un péptido de la presente invención para su uso como composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0199] En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para inhibir la señalización de la miostatina mediante el uso de un péptido de la presente invención. Ejemplos del método de la presente invención incluyen un método *in vivo, ex vitro* o *ex vivo*.

[0200] Composición de diagnóstico

La presente invención se refiere también a una composición de diagnóstico que incluye un péptido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0201] El péptido de la presente invención puede usarse también como composición para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida. Este agente de diagnóstico puede ser un agente de detección para diagnosticar si un sujeto padece una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida y, al usarse como agente de detección, el péptido puede ser marcado de manera detectable.

[0202] El péptido puede ser marcado de manera detectable. El péptido puede ser marcado con una enzima (por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina), una sustancia radiactiva (por ejemplo, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{3}H), un material fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de dansilo, ficoeritrina, isotiocianato de tetrametilrodamina, un material fluorescente del infrarrojo cercano) o un anticuerpo marcado con una sustancia luminiscente (por ejemplo, luciferasa, luciferina, aequorina). Además, puede usarse un anticuerpo marcado con nanopartículas tales como coloides de oro y puntos cuánticos para la detección. Por ejemplo, puede formarse un complejo entre el péptido y un anticuerpo que se une a una proteína que implica una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida; puede prepararse un complejo que tenga el anticuerpo o el péptido marcado; y, mediante la administración y detección del complejo marcado, puede detectarse la severidad y similares de la enfermedad relacionada con la miostatina o la enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida. Además, en un inmunoensayo, el péptido puede ser marcado con biotina y detectado uniendo la biotina a avidina o estreptavidina marcada con, por ejemplo, una enzima.

[0203] Entre los inmunoensayos, se prefiere la ELISA enlazada enzimáticamente por su simplicidad y rapidez en la medición de antígenos. Por ejemplo, se inmoviliza un anticuerpo en un vehículo en fase sólida, se añade una muestra y se hace reaccionar, y entonces se añade el péptido marcado y se hace reaccionar. Después del lavado, mediante la reacción con un substrato enzimático para desarrollar color y midiendo la absorbancia, puede detectarse la severidad y otras características de una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida. Después de la reacción de la muestra con el anticuerpo inmovilizado en el vehículo en fase sólida, puede añadirse un péptido no marcado, y el anticuerpo contra el péptido puede marcarse con una enzima y puede añadirse posteriormente. El anticuerpo puede ser inmovilizado sobre o dentro de la superficie del vehículo en fase sólida.

[0204] El substrato enzimático usado puede ser, por ejemplo, 3,3'-diaminobencidina (DAB), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) u o-fenilendiamina (OPD) en caso de que la enzima sea peroxidasa, y puede ser, por ejemplo, fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) en el caso de fosfatasa alcalina.

[0205] El término "vehículo en fase sólida" no es limitado en este contexto, siempre que pueda usarse para inmovilizar el anticuerpo. Ejemplos incluyen una placa de microtitulación de vidrio, metal o resina, un substrato o una perla, o una membrana de nitrocelulosa, nylon o PVDF. La sustancia objetivo puede ser inmovilizada en el vehículo en fase sólida siguiendo un procedimiento conocido.

[0206] La presente invención se refiere también a un kit de diagnóstico que incluye el péptido de la presente invención. El kit de diagnóstico incluye un reactivo y una herramienta (que incluye, pero no se limita a, cualquiera o todos los péptidos de la presente invención, un anticuerpo, un vehículo en fase sólida, una solución de regulador de pH, una solución de detención de la reacción enzimática y/o un lector de microplacas) necesarios para la detección mencionada.

[0207] La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida, el método incluyendo el uso de un péptido de la presente invención. El "método de diagnóstico" incluye métodos de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Se prefiere un método de diagnóstico *in vitro*. La presente invención se refiere también a un método para detectar una enfermedad mediante el uso del péptido de la presente invención. La enfermedad puede ser detectada, por ejemplo, por técnicos de laboratorio o investigadores no médicos, en institutos de investigación (incluyendo instituciones educativas tales como universidades), empresas u otros. En una modalidad, el método de detección de una enfermedad no incluye tratamiento médico.

[0208] La presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0209] La presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención en la

fabricación de una composición de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0210] La presente invención se refiere al uso de un péptido de la presente invención como una composición de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0211] La presente invención se refiere a un péptido de la presente invención para su uso en un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0212] La presente invención se refiere a un péptido de la presente invención para su uso como una composición de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0213] La presente invención se refiere a un probador que incluye un péptido de la presente invención. La presente invención se refiere a un probador de diagnóstico o de detección que incluye un péptido de la presente invención.

[0214] Composición de investigación

La presente invención se refiere también a una composición de investigación que incluye un péptido de la presente invención. La "composición de investigación" incluye aquellas usadas, por ejemplo, por investigadores, técnicos, estudiantes o médicos en institutos de investigación (incluyendo instituciones educativas tales como universidades), empresas, hospitales u otros.

[0215] La composición de investigación anterior puede usarse, por ejemplo, para la detección de la miostatina o la detección de una enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0216] El vehículo para inmovilizar el péptido no es limitado en la presente. Ejemplos incluyen una placa de microtitulación de vidrio, metal o resina, un substrato o una perla, o una membrana de nitrocelulosa, nylon o PVDF.

[0217] La presente invención incluye un método para detectar la miostatina mediante el uso de un péptido de la presente invención.

[0218] La presente invención incluye también el uso de un péptido de la presente invención para la detección de la miostatina.

[0219] La presente invención se refiere también a un kit de diagnóstico o de detección que incluye un péptido de la presente invención. El kit de diagnóstico o de detección incluye un reactivo y una herramienta (que incluye, pero no se limita a, cualquiera o todos los péptidos de la presente invención, un anticuerpo, un vehículo en fase sólida, una solución de regulador de pH, una solución de detención de la reacción enzimática y/o un lector de microplacas) necesarios para la detección mencionada.

[0220] La presente invención se refiere también a un método para poner a prueba un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo la prueba de por lo menos uno de:

a) solubilidad en un solvente,

b) actividad inhibidora de la miostatina,

c) toxicidad celular y/o tisular, o

d) toxicidad para un animal de experimentación,

en donde el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

[0221] La "solubilidad en un solvente" puede medirse usando métodos conocidos. Al medirse la solubilidad, el solvente no es ilimitado, y puede seleccionarse libremente dependiendo del propósito previsto. En cuanto al método de medición de la solubilidad, puede seleccionarse apropiadamente cualquiera de los métodos conocidos, dependiendo del tipo de solvente. Sin limitación, la solubilidad puede ser la solubilidad obtenida al disolver el péptido en un solvente conocido, tal como agua, glicerol, PBS o DMSO.

[0222] La "actividad inhibidora de la miostatina" puede medirse, por ejemplo, como se describe en "3. Péptido (B)".

[0223] La "toxicidad celular y/o tisular" puede medirse usando métodos conocidos. Por ejemplo, la prueba de la toxicidad celular y/o tisular puede ser una prueba de evaluación de toxicidad conocida que usa células y/o tejidos, y puede ser un método realizado *in vitro*. Las células y/o tejidos pueden ser, pero no se limitan a, células y/o tejidos que normalmente se evalúan y se ponen a prueba para determinar su toxicidad para productos farmacéuticos.

[0224] La "toxicidad para un animal de experimentación" puede medirse usando métodos conocidos. Por ejemplo, los animales de experimentación no son particularmente limitados, siempre que sean los de uso común, tales como ratones, ratas, conejillos de Indias, jerbos, hámsteres, hurones, conejos, perros, gatos, cerdos, cabras, caballos, ganado vacuno, aves (por ejemplo, pollos, codornices), monos y primates no humanos (por ejemplo, monos cinomolgus, titíes, monos rhesus).

[0225] Además, las pruebas de evaluación de la toxicidad mencionadas anteriormente pueden ser, pero no se limitan a, estudios de seguridad que suelen realizarse en estudios no clínicos de productos farmacéuticos. Ejemplos incluyen estudios de toxicidad general (estudios de toxicidad de una sola dosis y de dosis repetida), estudios de genotoxicidad (prueba de Ames, prueba de aberraciones cromosómicas, prueba de micronúcleos *in vitro*), estudios de carcinogenicidad, estudios de toxicidad reproductiva y del desarrollo (ICH-I, II, III), estudios de irritación local (estudios de irritación ocular y cutánea, o similares), otros estudios de toxicidad (prueba de sensibilización cutánea, prueba de fototoxicidad, prueba de antigenicidad) y evaluaciones químicas y bioanalíticas (TK/PK).

[0226] 6. Uso combinatorio, combinación

La presente invención puede usarse en combinación con un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad relacionada con la miostatina, o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida. En una modalidad, la presente invención se refiere a una combinación del péptido y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad relacionada con la miostatina, o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida.

[0227] Pueden administrarse simultánea o secuencialmente el péptido y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad relacionada con la miostatina o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida. De preferencia, el péptido y un medicamento para prevenir o tratar otra enfermedad relacionada con la miostatina, o una enfermedad o síntoma asociado con una función muscular reducida, se administran para lograr un efecto aditivo, de preferencia sinérgico. Cuando se administran secuencialmente, el orden de administración es irrelevante. Cuando se administran secuencialmente, es preferible, sin limitación, que ambos se administren en un plazo de 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos o 5 minutos.

[0228] Los temas descritos en otras secciones se aplican también a esta sección, a menos que se indique de otra manera.

EJEMPLOS

[0229] En lo sucesivo, la presente invención se describe adicionalmente con más detalle mediante ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos. El experto en la técnica puede hacer fácilmente modificaciones y cambios a la presente invención con base en la descripción presentada en la presente, los cuales se incluyen en su alcance técnico. Nótese que los nombres de los compuestos que se dan en los siguientes ejemplos de referencia y ejemplos, no siguen necesariamente la nomenclatura de la IUPAC. Nótese también que pueden usarse abreviaturas para simplificar la descripción, pero estas abreviaturas son las indicadas anteriormente.

[0230] Las materias primas, los componentes básicos, los reactivos, los ácidos, las bases, las resinas en fase sólida y los solventes usados en la síntesis química de los compuestos eran productos comerciales tal cual o, cuando se especificaba de otra manera, se sintetizaron usando química orgánica. Nótese que los aminoácidos con grupo protector eran productos comerciales tal cual.

[0231] En cuanto a la numeración de los residuos peptídicos, el residuo de aminoácido modificado con ClAc se contabiliza como residuo 1, y los residuos subsiguientes como residuo 2, residuo 3, y así sucesivamente, hasta la resina. Los aminoácidos comunes usados se enlistan a continuación, y cada grupo protector de la cadena lateral se indica entre paréntesis.

[0232] Fmoc-Phe-OH;

Fmoc-Val-OH;

Fmoc-Trp(Boc)-OH;
Fmoc-Arg(Pbf)-OH;
Fmoc-Ala-OH H_2O;
Fmoc-Gly-OH;
Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH;
Fmoc-Ile-OH;
Fmoc-Leu-OH;
Fmoc-Asn(Trt)-OH;
Fmoc-Asp(OMpe)-OH;
Fmoc-(Dmb)Gly-OH (CAS 166881-42-1);
Fmoc-D-Pro-OH;
Fmoc-Cys(Trt)-OH;
Fmoc-Lys(Boc)-OH.

[0233] Además, para los aminoácidos no naturales, se utilizaron lo siguiente y lo que se menciona en las abreviaturas.

[0234] Fmoc-dp-OH;
Fmoc-de(tBu)-OH;
Fmoc-KCOpipzaa(tBu)-OH;
Fmoc-W4N-OH;
Fmoc-W7N-OH;
Fmoc-Me4Py-OH;
Fmoc-MeE(tBu)-OH;
Fmoc-MeF-OH;
Fmoc-MeY(tBu)-OH;
Fmoc-MeA-OH;
Fmoc-MeG-OH;
Fmoc-W4F-OH;
Fmoc-W7F-OH;
Fmoc-MeF2F-OH;
Fmoc-3Py6NH2(Boc)-OH;
Fmoc-Kac-OH;
Fmoc-W73Pyz1Me(Boc)-OH;
Fmoc-W7Ph3C-OH;
Fmoc-MeF4C-OH;
Fmoc-PEG8c-OH;

Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH;
Fmoc-W6H(Boc,Boc)-OH;
Fmoc-MeDap(alloc)-OH (CAS: 2973753-13-6);
Fmoc-MeF4am(alloc)-OH (CAS: 2973754-55-9);
Fmoc-MeHgl(alil)-OH (2973754-77-5);
Fmoc-Hgl(alil)-OH (CAS: 133464-45-6);
Fmoc-CeG(alil)-OH (CAS: 174800-18-1);
Fmoc-Ano-OH (CAS: 1262886-65-6);
Fmoc-Ado-OH (CAS: 1338002-17-7);
Fmoc-F4COO(tBu)-OH (CAS: 183070-44-2);
Fmoc-F3aao(tBu)-OH (CAS: 2973753-95-4);
Fmoc-CrpG(tBu)-OH (CAS: 174799-90-7);
Fmoc-de(alil)-OH (CAS: 204251-33-2);
Fmoc-da-OH (CAS: 79990-15-1);
Fmoc-W1Ph4COO(tBu)-OH;
Fmoc-CrpG(alil)-OH (CAS: 1403683-46-4);
Fmoc-4Py-OH (CAS: 169555-95-7);
Fmoc-ApG(Boc)-OH (CAS: 143192-31-8);
Fmoc-Dap(Boc)-OH (CAS: 162558-25-0);
Fmoc-F4CON-OH (CAS: 204716-17-6);
Fmoc-Cha-OH (CAS: 135673-97-1);
Fmoc-Pip4mAc-OH (CAS: 154938-68-8);
Fmoc-EtG-OH (CAS: 162545-29-1);
Fmoc-Bph-OH (CAS: 199110-64-0);
Fmoc-F44Py-OH (CAS: 1282042-56-1);
Fmoc-Ahp-OH (CAS: 1197020-22-6);
Fmoc-Me3Py-OH (CAS: 1979173-93-7);
Fmoc-Ade-OH (CAS: 193885-59-5);
Fmoc-F4F-OH (CAS: 169243-86-1);
Fmoc-PipzAc-OH (CAS: 180576-05-0);
Fmoc-F3CON-OH (CAS: 959573-22-9);
Fmoc-dkCOpipzaa(tBu)-OH (CAS: 2973752-83-7);
Fmoc-MeKCOpipzaa(tBu)-OH (CAS: 2973752-84-8);
Fmoc-MeC(Trt)-OH (CAS: 944797-51-7);
Fmoc-Medc(Trt)-OH (CAS: 1349807-46-0);

Fmoc-Hcy(Trt)-OH (CAS: 167015-23-8);
Fmoc-dhcy(Trt)-OH (CAS: 2991226-74-3);
Fmoc-Aeoac-OH (CAS: 260367-12-2);
Fmoc-Ape-OH (CAS: 123622-48-0);
Fmoc-Pic4-OH (CAS: 148928-15-8);
Fmoc-ddab(alloc)-OH (CAS: 387824-78-4);
Fmoc-dorn(alloc)-OH (CAS: 214750-74-0);
Fmoc-KMe(alloc)-OH (CAS: 2246708-86-9);
Fmoc-mBph-OH (CAS: 1260616-69-0);
Fmoc-MeE(alil)-OH (CAS: 2444356-85-6);
Fmoc-de-OtBu (CAS: 109745-15-5);
Fmoc-dcaa-OtBu.

[0235] La estructura de cada péptido sintetizado químicamente se determinó mediante ESI-MS(+) en espectrometría de masas para confirmar el peso molecular calculado considerando los aminoácidos usados de acuerdo con la secuencia objetivo y los componentes básicos usados, según fuese necesario. Nótese que el término "ESI-MS(+)" indica espectrometría de masas de ionización por electroaspersión realizada en modo de iones positivos. Las masas detectadas se expresan en unidades de "m/z". Nótese que cuando el peso molecular era aproximadamente mayor de 1000, el compuesto se detectaba con frecuencia como un ión divalente o trivalente.

Condiciones analíticas A

Columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm, ID 2.1 x 150 mm, 100 Å (Phenomenex, Inc.)
Temperatura de la columna: 60°C
Fase móvil A: TFA a 0.025% (en agua)
Fase móvil B: TFA a 0.025% (en CH_3CN)
Gradiente: 20-60% por 20 minutos
Magnitud de flujo: 0.25 ml/min
Detección: PDA (225 nm).

Condiciones analíticas B

Columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm, ID 2.1 x 150 mm, 100 Å (Phenomenex, Inc.)
Temperatura de la columna: 60°C
Fase móvil A: TFA a 0.025% (en agua)
Fase móvil B: TFA a 0.025% (en CH_3CN)
Gradiente: 20-60% por 7.2 minutos
Magnitud de flujo: 0.5 ml/min
Detección: PDA (225 nm).

Condiciones analíticas C

Columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm, ID 2.1 x 150 mm, 100 Å (Phenomenex, Inc.)

Temperatura de la columna: 60°C

Fase móvil A: TFA a 0.025% (en agua)

Fase móvil B: TFA a 0.025% (en CH_3CN)

Gradiente: 40-80% por 7.2 minutos

Magnitud de flujo: 0.5 ml/min

Detección: PDA (225 nm).

Condiciones analíticas D

Columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm, ID 2.1 x 150 mm, 100 Å (Phenomenex, Inc.)

Temperatura de la columna: 60°C

Fase móvil A: TFA a 0.025% (en agua)

Fase móvil B: TFA a 0.025% (en CH_3CN)

Gradiente: 5-45% por 7.2 minutos

Magnitud de flujo: 0.5 ml/min

Detección: PDA (225 nm).

[0236]

EJEMPLO 1

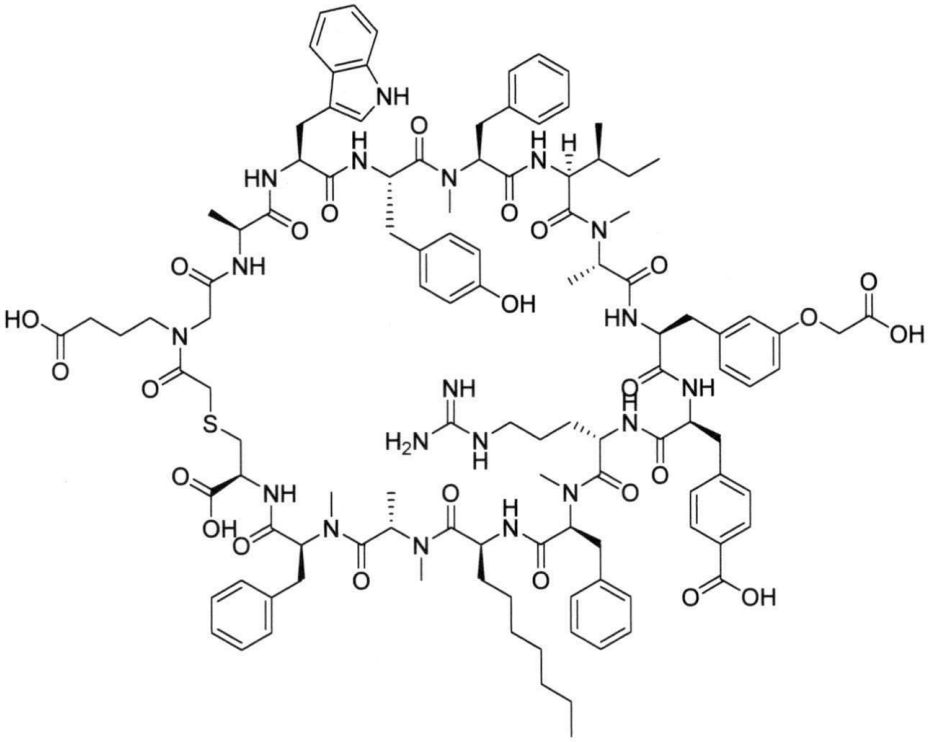
En este ejemplo, se sintetizaron los siguientes péptidos o péptidos unidos a un enlazador.

[0237]

EJEMPLO 1-1

Síntesis de Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30)

[0238] [Fórmula química 33]



[0239] Se usó la resina H-dc(Trt)-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.83 mmoles/g, 1.20 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0240] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 25°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 1, 4, 10, 12 y 13 a 25°C por 30 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 6 a 25°C por 60 minutos. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía piperidina a 20% a 25°C por 5 minutos.

[0241] Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, en la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; y se añadieron ClAcOH 0.13 M (en DMF)/HATU 0.13 M (en DMF)/DIEA 0.25 M (en DMF) (5.2 equivalentes/5 equivalentes/10 equivalentes) a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 60 minutos a 25°C.

[0242] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (30 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 90:2.5:2.5:5.0 se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0243] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C durante 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMSO/agua/acetonitrilo (2/1/1) hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 60 minutos; y añadiendo DODT a una concentración de 1%. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0244] El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 250 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 15.4-12.2% durante 0.1 minutos, 12.2-12.2% durante 4.9 minutos, 12.2-15.4% durante 2 minutos, 15.4-40.8% durante 3 minutos, 40.8-45.9% durante 15 minutos, 45.9-60% durante 3 minutos; magnitud de flujo: 118-18 ml/min durante 0.1 minutos, 18-18 ml/min durante 4.9 minutos, 18-118 ml/min durante 2 minutos, y finalmente 118 ml/min. Después de la liofilización, se realizó la purificación usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 15-15% durante 2 minutos, 15-40% durante 1 minuto, 40-45% durante 8 minutos, entonces 45-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0245] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.1%.

[0246] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.96 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN);

temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

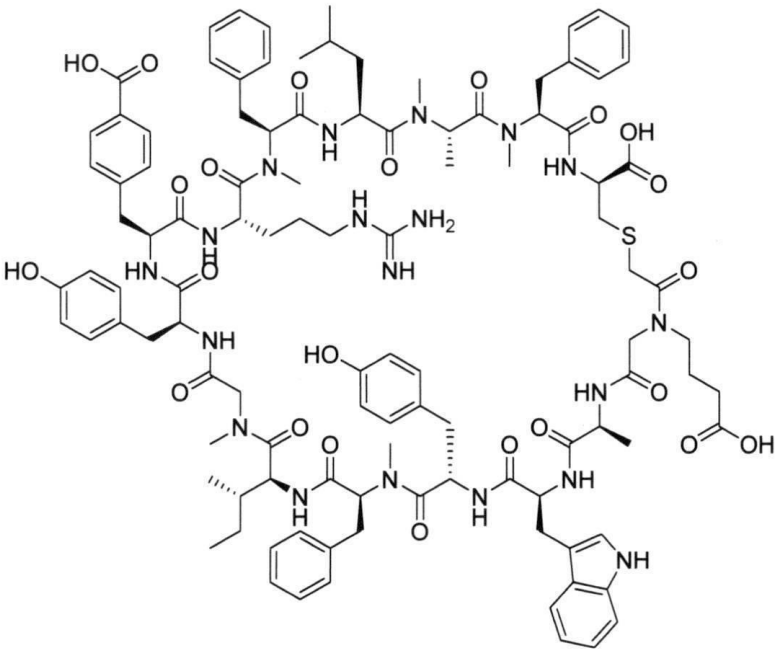
ESI-MS(+): m/z observada = 1109.04 $(M+2H)^{2+}$.

[0247]

EJEMPLO 1-2

Síntesis de Myostatin 99 Variant 07 (SEQ ID NO: 3)

[0248] [Fórmula química 34]



[0249] Se usó la resina H-dc(Trt)-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.83 mmoles/g, 1.20 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0250] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 25°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 10, 12 y 13 a 25°C por 60 minutos. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía piperidina a 20% a 25°C por 5 minutos. Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, en la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; y se añadieron

ClAcOH 0.1 M (en DMF)/HATU 0.1 M (en DMF)/DIEA 0.2 M (en DMF) (5 equivalentes/5 equivalentes/10 equivalentes) a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 30 minutos a 25°C.

[0251] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (20 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a cada uno de los dos recipientes de reacción que contenían la resina en fase sólida, y cada recipiente se agitó a temperatura ambiente por 40 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de éter dietílico/hexano (1/1), el solvente mixto se enfrió hasta 0°C, y se produjo un precipitado turbio.

[0252] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 120 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0253] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 33-33% durante 3 minutos, 33-38% durante 8 minutos, 38-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 2 minutos, entonces 120 ml/min).

[0254] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.8%.

[0255] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.04 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

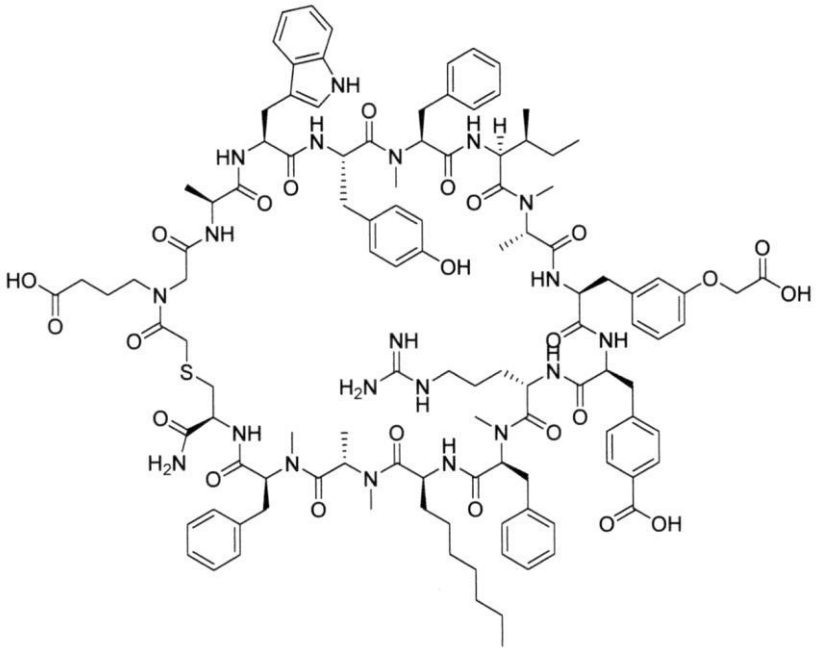
ESI-MS(+): m/z observada = 1051.58 $(M+2H)^{2+}$.

[0256]

EJEMPLO 1-3

Síntesis de Myostatin_99_v196 (SEQ ID NO: 67)

[0257] [Fórmula química 35]



[0258] Se usó resina de amida Sieber (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.57 mmoles/g, 0.22 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0259] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/ Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 3 minutos a 90°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4 y 12 a 90°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 5 a 90°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 6 y 13 a 75°C por 30 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 10 a 50°C por 15 minutos. La reacción se llevó a cabo una vez para el residuo 15 a 50°C por 15 minutos. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción una vez con una solución de DMF que contenía piperidina a 20% a 75°C por 3 minutos. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 10, 12 y 13 a 25°C por 5 minutos. Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, en la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; y se añadieron ClAcOH 0.21 M (en DMF)/HATU 0.21 M (en DMF)/DIEA 0.42 M (en DMF) (5

equivalentes/5 equivalentes/10 equivalentes) a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 30 minutos a 25°C.

[0260] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (7 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5 se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y se agitó a temperatura ambiente por 35 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0261] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 21 horas; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0262] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 17-17% durante 2 minutos, 17-42% durante 1 minuto, 42-47% durante 8 minutos, 47-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0263] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 95.0%.

[0264] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 6.12 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

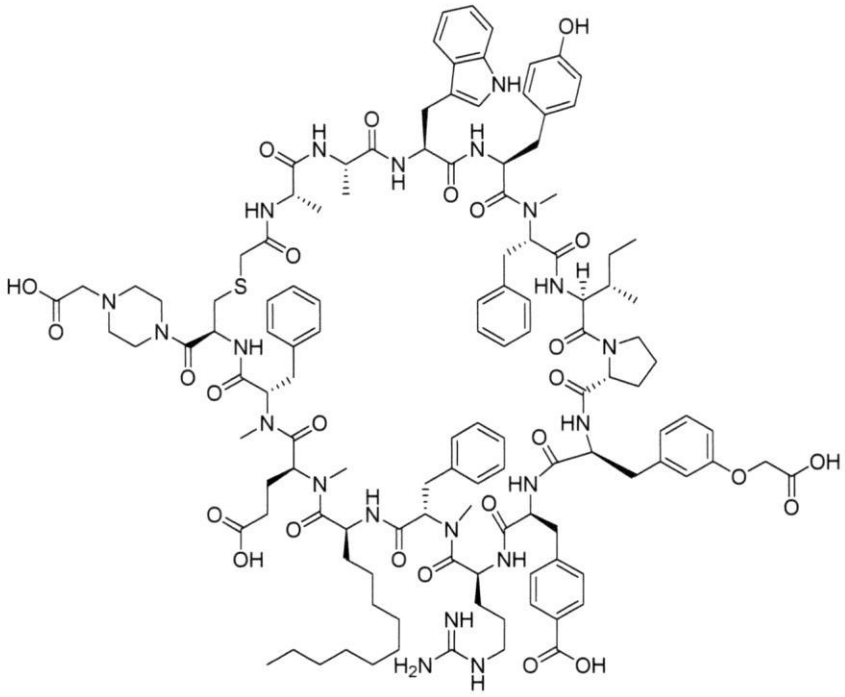
ESI-MS(+): m/z observada = 1108.16 $(M+2H)^{2+}$.

[0265]

EJEMPLO 1-4

Síntesis de Myostatin_99_v309 (SEQ ID NO: 94)

[0266] [Fórmula química 36]



[0267] La resina Cl-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.79 mmoles/g, 95 mg) hinchada con DCM se suspendió en una solución de DCM/DMF (9/1) que contenía 2 equivalentes de Fmoc-pipzAc-OH, se añadieron 4 equivalentes de DIEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 90 minutos. Se añadió metanol en exceso, y la mezcla se agitó por 30 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. Una porción (0.79 mmoles/g, 0.095 g) de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Syro I de Biotage como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0268] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1.05 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8.4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo dos veces por 60 minutos a 25°C. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción con una solución de DMF que contenía piperidina a 20% a 25°C por 5 minutos, seguida de la reacción por 10 minutos. Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, en la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito

anteriormente; y se añadieron 10 equivalentes de ClAcOSu a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 60 minutos a 25°C.

[0269] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (3 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 45 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0270] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMSO/agua/acetonitrilo (1/1/1) hasta una concentración final de 2 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0271] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 13-13% durante 2 minutos, 13-38% durante 1 minuto, 38-43% durante 8 minutos, 43-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0272] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 98.9%.

[0273] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.22 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

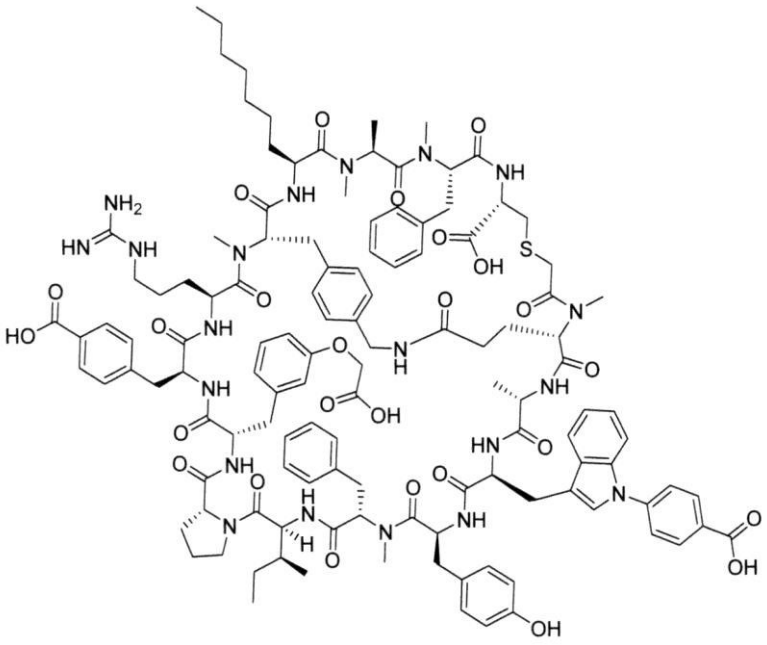
ESI-MS(+): m/z observada = 1191.89 $(M+2H)^{2+}$.

[0274]

EJEMPLO 1-5

Síntesis de Myostatin_99_v423 (SEQ ID NO: 290)

[0275] [Fórmula química 37-1]



[0276] Se permeó la resina Cl-TCP(Cl) ProTide (CEM; 0.36 mmoles/g, 0.69 g) hinchada con DCM usando una mezcla de DCM/DMF (10/1) que contenía 4 equivalentes de Fmoc-dc(Trt)-OH y 8 equivalentes de DIEA por 120 minutos. Se añadió un exceso de metanol, y la mezcla se agitó por 10 minutos. Después de lavado con DMF, DCM y éter dietílico, la mezcla se secó bajo presión reducida. La resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue HT de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0277] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 40°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 7, 10, 12 y 13 a 40°C por 30 minutos. Se usó Fmoc-MeE(alil)-OH para la reacción del residuo 1, y Fmoc-MeF4am(alloc)-OH para la reacción del residuo 11. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 5 minutos. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 2 a 25°C por 1 minuto. En este caso, se hizo reaccionar 1 equivalente de la resina en fase sólida resultante con 5 equivalentes de Fmoc-OSu por 60 minutos, seguido de un lavado con

DMF. Se suspendió un equivalente de la resina en fase sólida obtenida en ácido acético/DCM (8 mL; 2/98), se añadieron 0.3 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 20 equivalentes de fenilsilano, se permeó por 60 minutos, se lavó con DCM, y se lavó con DMF. La resina en fase sólida resultante se suspendió en DMF, y se agitó con 1.2 equivalentes de PyAOP y 5 equivalentes de DIEA a 25°C por 60 minutos. Después de lavado con DMF, la resina en fase sólida obtenida se hizo reaccionar con una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina por 25 minutos a 25°C, y se lavó con DMF.

[0278] La resina en fase sólida que tenía el péptido, del cual se había removido el grupo Fmoc, se mezcló con ClAcOH 0.16 M (en DMF)/ HATU 0.16 M (en DMF)/DIEA 0.32 M (en DMF) (5 equivalentes/5 equivalentes/10 equivalentes), y la mezcla se agitó por 60 minutos a 25°C para introducir un grupo cloroacetilo.

[0279] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (14 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó entonces a temperatura ambiente por 40 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0280] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 1.4 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 60 minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0281] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 38-38% durante 3 minutos, 38-43% durante 8 minutos, 43-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 2 minutos, entonces 120 ml/min).

[0282] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma

de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 95.0%.

[0283] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.87 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

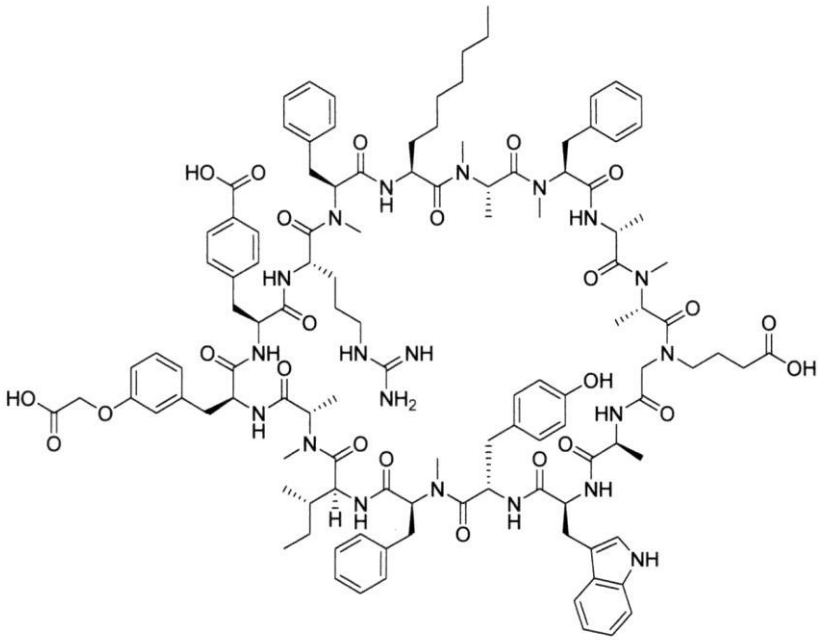
ESI-MS(+): m/z observada = 1180.10 $(M+2H)^{2+}$.

[0284]

EJEMPLO 1-6

Síntesis de Myostatin_99_v450 (SEQ ID NO: 302)

[0285] [Fórmula química 37-2]



[0286] Se usó la resina HA-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.83 mmoles/g, 0.15 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina.

[0287] El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. Posteriormente, el péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones enlistadas en el cuadro 1 siguiente.

[0288]

CUADRO 1

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
3	15	Fmoc-da-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
5	13	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
11	7	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
12	6	Fmoc-I-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
15	3	Fmoc-W(Boc)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces

[0289] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (4 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0290] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó.

El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMF hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1.2 equivalentes de HATU y 3 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0291] El residuo resultante se lavó con éter diisopropílico, entonces con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (4 mL; una mezcla de TFA/TIS/H_2O a una relación de volumen de 95/2.5/2.5), y se agitó por 15 minutos. La solución de reacción resultante se añadió a éter dietílico, y se formó un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0292] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 18-18% durante 2 minutos, 18-43% durante 1 minuto, 43-48% durante 8 minutos, 48-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0293] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 92.0%.

[0294] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.88 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

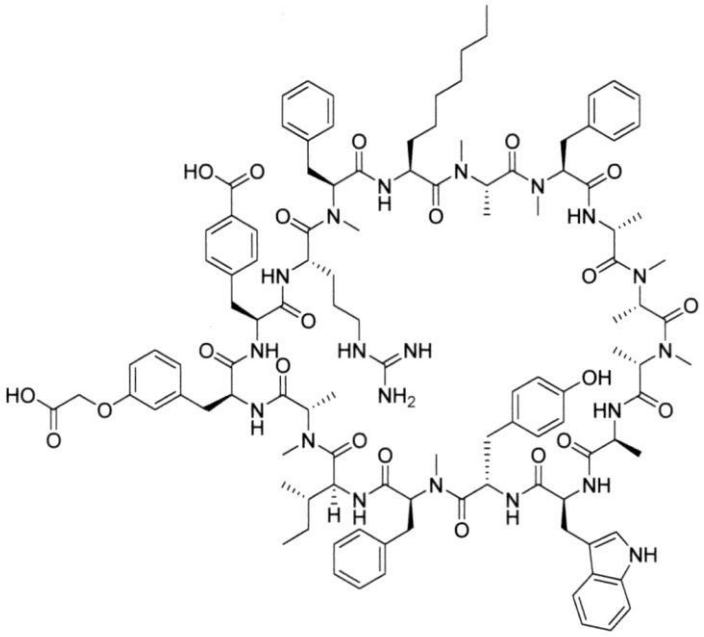
ESI-MS(+): m/z observada = 1106.21 $(M+2H)^{2+}$.

[0295]

EJEMPLO 1-7

Síntesis de Myostatin_99_v456 (SEQ ID NO: 308)

[0296] [Fórmula química 38]



[0297] La resina Cl-TCP(Cl) ProTide (CEM; 1.08 mmoles/g, 0.56 g) hinchada con DCM fue permeada con una solución de DCM/DMF (5/1) que contenía 0.5 equivalentes de Fmoc-da-OH y 1.5 equivalentes de DIEA por 60 minutos. Se añadió un exceso de metanol, y la mezcla se agitó por 10 minutos. Después de lavado secuencial con DMF, DCM y éter dietílico, la mezcla se secó bajo presión reducida. Una parte de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina.

[0298] El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. El péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones que se indican en el cuadro 2 siguiente.

[0299]

CUADRO 2

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	15	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
2	14	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
3	13	Fmoc-Ano-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
4	12	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
5	11	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
6	10	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
7	9	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
8	8	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
9	7	Fmoc-I-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
10	6	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
11	5	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
12	4	Fmoc-W(Boc)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
13	3	Fmoc-A-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
14	2	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
15	1	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
16	16	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces

[0300] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (6 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el

filtrado anterior. Cuando este filtrado se añadió a una cantidad excesiva de solvente mixto de éter diisopropílico enfriado hasta 0°C, se formó un precipitado turbio. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMF hasta una concentración final de 2.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1 equivalente de HATU y 5 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0301] El residuo resultante se lavó con éter dietílico y se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (5 mL; una mezcla de TFA/TIS/H_2O a una relación de volumen de 95/2.5/2.5), y se agitó por 20 minutos. La solución de reacción resultante se añadió a éter diisopropílico/hexano (1/1), y se formó un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0302] El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 250 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 22.5-20% durante 0.1 minutos, 20-20% durante 4.9 minutos, 20-22.5% durante 2 minutos, 22.5-48% durante 3 minutos, 48-53% durante 15 minutos, 53-60% durante 3 minutos; magnitud de flujo: 118-18 mL/min durante 0.1 minutos, 18-118 mL/min durante 4.9 minutos, entonces 118 mL/min).

[0303] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 94.4%.

[0304] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 7.08 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

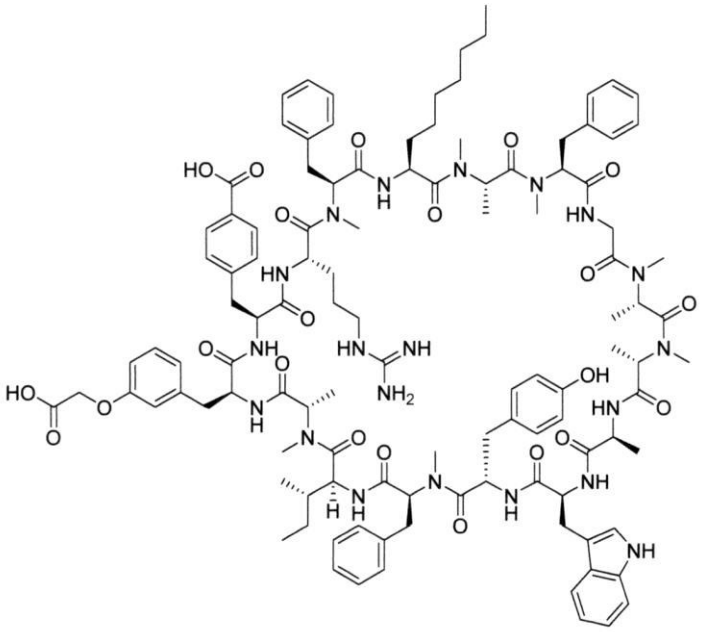
ESI-MS(+): m/z observada = 1077.06 $(M+2H)^{2+}$.

[0305]

EJEMPLO 1-8

Síntesis de Myostatin_99_v455 (SEQ ID NO: 307)

[0306] [Fórmula química 39]



[0307] Se usó la resina HG-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.86 mmoles/g, 0.15 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina. El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. El péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones que se indican en el cuadro 3 siguiente.

[0308]

CUADRO 3

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	14	Fmoc-MeF-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
2	13	Fmoc-MeA-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
3	12	Fmoc-Ano-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
4	11	Fmoc-MeF-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
5	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
6	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
7	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
8	7	Fmoc-MeA-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
9	6	Fmoc-I-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
10	5	Fmoc-MeF-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
11	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
12	3	Fmoc-W(Boc)-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
13	2	Fmoc-A-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
14	1	Fmoc-MeA-OH	25°C, 30 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
15	16	Fmoc-MeA-OH	25°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces

[0309] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (6 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado se concentró bajo presión reducida. Al añadir éter diisopropílico, se produjo un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y

entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMF hasta una concentración final de 2.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1 equivalente de HATU y 5 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0310] El residuo resultante se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (5 mL; una mezcla de TFA/TIS/H_2O a una relación de volumen de 95/2.5/2.5), y se agitó por 20 minutos. La solución de reacción resultante se añadió a éter diisopropílico/hexano (1/1), y se formó un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0311] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 22-22% durante 2 minutos, 22-47% durante 1 minuto, 47-52% durante 8 minutos, 52-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0312] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.5%.

[0313] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 3.44 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 40-80% durante 7.15 minutos, entonces 80-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

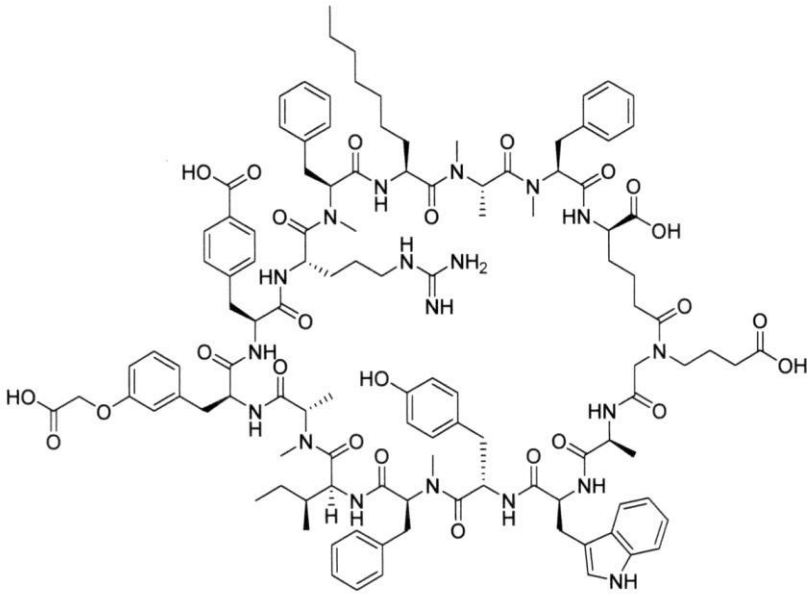
ESI-MS(+): m/z observada = 1070.05 $(M+2H)^{2+}$.

[0314]

EJEMPLO 1-9

Síntesis de Myostatin_99_v434 (SEQ ID NO: 291)

[0315] [Fórmula química 40-1]



[0316] La resina Cl-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.35 mmoles/g, 0.37 g) hinchada con DCM, se suspendió en una solución de DCM/DMF (30 mL, 4/1) que contenía 4 equivalentes de Fmoc-dhgl-OtBu, y se añadieron 8 equivalentes de DIEA. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 180 minutos. Se añadió metanol en exceso, y la mezcla se agitó por 30 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. Una porción (0.90 mmoles/g, 0.27 g) de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0317] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 25°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 10, 12 y 13 a 25°C por 30 minutos. El Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 1 minuto.

[0318] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (10 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida,

y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado se concentró bajo presión reducida. Al añadir éter diisopropílico, se produjo un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en DMF a una concentración final de 5 mM con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1.2 equivalentes de HATU y 6 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 20 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite. El residuo resultante se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (5 mL; una mezcla de TFA/H_2O a una relación de volumen de 97.5/2.5), y se agitó por 30 minutos. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida, y se secó.

[0319] El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 250 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 16.4-13.3% durante 0.1 minutos, 13.3-13.3% durante 4.9 minutos, 13.3-16.4% durante 2 minutos, 16.4-41.9% durante 3 minutos, 41.9-46.9% durante 15 minutos, 46.9-60% durante 3 minutos; magnitud de flujo: 118-18 mL/min durante 0.1 minutos, 18-18 mL/min durante 4.9 minutos, 18-118 mL/min durante 2 minutos, entonces 118 mL/min).

[0320] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.7%.

[0321] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.82 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

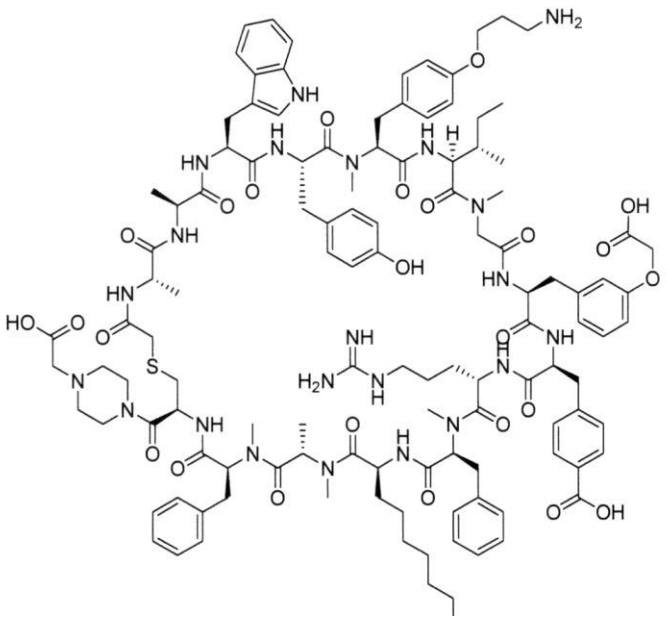
ESI-MS(+): m/z observada = 1099.58 $(M+2H)^{2+}$.

[0322]

EJEMPLO 1-10

Síntesis de Myostatin_99_v302 (SEQ ID NO: 195)

[0323] [Fórmula química 40-2]



[0324] La resina Cl-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.79 mmoles/g, 4.1 g) hinchada con DCM, se suspendió en una solución de DCM/DMF (9/1) que contenía 2 equivalentes de Fmoc-pipzAc-OH, y se añadieron 4 equivalentes de DIEA. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 90 minutos. Se añadió metanol en exceso, y la mezcla se agitó por 30 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. Una porción (0.79 mmoles/g, 0.095 g) de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Syro I de Biotage como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0325] Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1.1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8.4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo dos veces por 60 minutos a 25°C. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción con una solución de DMF que contenía piperidina a 20% a 25°C por 5 minutos, seguido de la reacción por 10 minutos. Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, en la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; y se añadieron 10 equivalentes de ClAcOSu a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 60 minutos a 25°C.

[0326] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (3 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 45 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0327] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviendo el péptido en DMSO/agua/acetonitrilo (1/1/1) hasta una concentración final de 2 mM con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12. El residuo resultante se disolvió en DMF (5 mL), se añadieron 0.05 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$, 0.1 ML de piperidina y 20 equivalentes de dimetilamina borano (CAS 74-94-2), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 150 minutos.

[0328] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 μm 19 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de B): 5-30% durante 3 minutos, 30-35% durante 8 minutos, 35-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 17 ml/min).

[0329] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 99.6%.

[0330] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 3.90 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

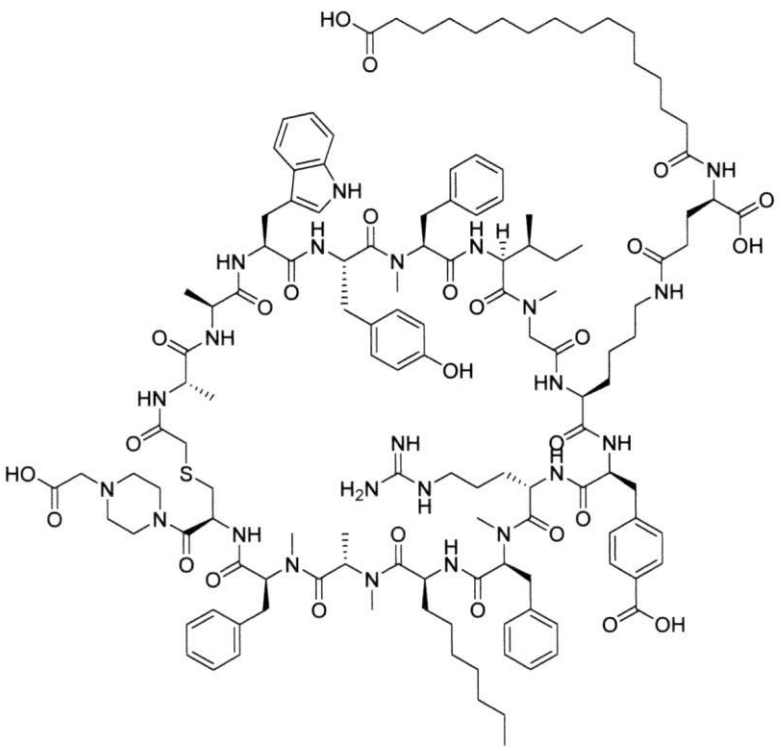
ESI-MS(+): m/z observada = 777.2 $(M+3H)^{3+}$.

[0331]

EJEMPLO 1-11

Síntesis de Myostatin_99_v292 (SEQ ID NO: 189)

[0332] [Fórmula química 41]



.

[0333] La resina HMPB-MBHA (Novabiochem; 0.92 mmoles/g, 0.14 g) hinchada con DCM, se suspendió en 4 equivalentes de Fmoc-pipzAc-OH y 0.4 equivalentes de solución de DCM/DMF (9/1). Se añadieron 4 equivalentes de DIC, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF que contenía DIEA a 1%, DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. La resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0334] Para la introducción de cada uno del residuo 15 al residuo 8, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 3 minutos a 90°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 10 y 15 a 50°C por 15 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 12 a 75°C por 30 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 13 y 14 a 90°C por 10 minutos. Se usó Alloc-K(Fmoc)-OH para la reacción del residuo

8. Para una reacción de elongación de la cadena lateral del residuo 8, la reacción se llevó a cabo una vez a 90°C por 10 minutos. Se introdujo Fmoc-de-OtBu, se removió el grupo Fmoc, y entonces se añadió HO-cC14COO-tBu. Además, se removió el Fmoc mediante una reacción doble con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 1 minuto. La resina en fase sólida obtenida se suspendió en diclorometano que contenía HFIP a 1%, y se añadieron 0.2 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 10 equivalentes de fenilsilano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos, y se lavó con diclorometano y entonces DMF.

[0335] Para la introducción de cada uno del residuo 7 al residuo 1 a la resina en fase sólida resultante, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 3 minutos a 90°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 4 a 90°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 6 y 7 a 75°C por 30 minutos. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción doble con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 1 minuto. Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: el grupo Fmoc del grupo α-amino se removió de la resina en fase sólida, sobre la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; y se añadió una solución de DMF (6 mL) que contenía 10 equivalentes de ClAcOSu a la resina en fase sólida, y la mezcla se agitó por 60 minutos a 25°C.

[0336] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después del paso de introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (7 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5:2.5:2.5:2.5 se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 40 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de un solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0337] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMSO/agua/acetonitrilo (1/2/2) hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 300

minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0338] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 18-18% durante 2 minutos, 18-43% durante 1 minuto, 43-48% durante 8 minutos, 48-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0339] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 97.9%.

[0340] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.90 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

ESI-MS(+): m/z observada = 1281.0 $(M+2H)^{2+}$.

[0341]

EJEMPLO 2

Análisis del péptido

Los péptidos objetivo se sintetizaron de acuerdo con los métodos comunes descritos anteriormente.

[0342]

CUADRO 4-1

SEQ ID No.	Nombre del péptido	Ciclización	Seq															Adicional /Enlazador	terminal	m/z	[M+XH] X+	Tiempo de retención	Condiciones analíticas
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
3	Myostatin_99_Variant_07	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1051.6	2	5.04	B
4	Myostatin_99_v31	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	G de G dk	-OH	820.7	3	3.02	B
5	Myostatin_99_v41	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	3Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1022.5	2	4.05	B
6	Myostatin_99_v43	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1059.2	2	4.77	B
7	Myostatin_99_v44	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4CON	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1043.7	2	4.6	B
8	Myostatin_99_v45	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F3CON	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1043.7	2	4.58	B
9	Myostatin_99_v46	ClAc-	CmG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1036.7	2	4.64	B
10	Myostatin_99_Variant_20-OH	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1044.1	2	4.84	B
11	Myostatin_99_Variant_21-OH	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1044.5	2	3.93	B
12	Myostatin_99_v83	ClAc-	CrpG	A	F44Py	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1121.6	2	4.34	B
13	Myostatin_99_v84	ClAc-	CrpG	A	F44Py	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1114.6	2	4.15	B
14	Myostatin_99_v85	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1121.1	2	6.12	B
15	Myostatin_99_v86	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1114.1	2	5.97	B
16	Myostatin_99_v91	ClAc-	CrpG	G	F44Py	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1115	2	4.22	B
17	Myostatin_99_v92	ClAc-	CrpG	G	F44Py	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1107.5	2	4.03	B
18	Myostatin_99_v96	ClAc-	MeD	A	F44Py	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1107.9	2	4.22	B
19	Myostatin_99_v107	ClAc-	A	A	F44Py	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1078.9	2	4.11	B
20	Myostatin_99_v108	ClAc-	A	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1078.4	2	5.89	B
21	Myostatin_99_v109	ClAc-	A	A	Bph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1122.6	2	4.36	B
22	Myostatin_99_v110	ClAc-	CrpG	S	F44Py	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1122.1	2	5.72	B
23	Myostatin_99_v116	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeY	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	5.7	B
24	Myostatin_99_v117	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeY	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1128.6	2	5.92	B
25	Myostatin_99_v118	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeY	I	Meda	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1114.5	2	5.37	B
26	Myostatin_99_v123	ClAc-	CrpG	A	F44Py	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-NH2	1121.5	2	4.19	B
27	Myostatin_99_v124	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1103	2	5.2	B
28	Myostatin_99_v135	ClAc-	CrpG	A	F44Py	Y	MeF	Gcpe	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1127.6	2	4.59	B
29	Myostatin_99_v144	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1087.7	2	5.54	B
30	Myostatin_99_v145	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1109	2	5.96	B
31	Myostatin_99_v148	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1109.2	2	5.4	B
32	Myostatin_99_v150	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1123.7	2	6.14	B
33	Myostatin_99_v153	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4aao	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1124.2	2	5.44	B
34	Myostatin_99_v156	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1080.7	2	5.01	B
35	Myostatin_99_v158	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1095.6	2	5.48	B
36	Myostatin_99_v159	ClAc-	A	S	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1073.6	2	5.77	B
37	Myostatin_99_v160	ClAc-	A	S	W7N	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1074.1	2	5.19	B
38	Myostatin_99_v161	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1109.6	2	5.5	B
39	Myostatin_99_v162	ClAc-	CrpG	S	W7N	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1110.09	2	4.98	B
40	Myostatin_99_v163	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1116.6	2	5.95	B
41	Myostatin_99_v164	ClAc-	CrpG	S	W7N	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1117.2	2	5.31	B

42	Myostatin_99_v165	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1101.6	2	5.64	B
43	Myostatin_99_v166	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1102.1	2	5.14	B
44	Myostatin_99_v167	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1072.6	2	5.6	B
45	Myostatin_99_v168	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1073.1	2	4.97	B
46	Myostatin_99_v169	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1065.1	2	4.68	B
47	Myostatin_99_v170	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1065.6	2	4.48	B
48	Myostatin_99_v171	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1059.6	2	5.04	B
49	Myostatin_99_v172	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1015.6	2	5.16	B
50	Myostatin_99_v173	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1080.7	2	5.65	B
51	Myostatin_99_v174	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1065.7	2	5.81	B
52	Myostatin_99_v175	ClAc-	A	S	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1024	2	4.82	B
53	Myostatin_99_v176	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1070.6	2	5.63	B
54	Myostatin_99_v178	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1059	2	5.17	B
55	Myostatin_99_v179	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1091.1	2	6.34	B
56	Myostatin_99_v181	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1080	2	5.79	B
57	Myostatin_99_v182	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1077.1	2	6.09	B
58	Myostatin_99_v184	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1099.1	2	5.82	B
59	Myostatin_99_v186	ClAc-	CrpG	S	Bph	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1078.2	2	5.92	B
60	Myostatin_99_v188	ClAc-	CrpG	S	W	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1066.7	2	5.44	B
61	Myostatin_99_v189	ClAc-	A	A	Bph	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1034.2	2	6.2	B
62	Myostatin_99_v191	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1022.7	2	5.66	B
63	Myostatin_99_v192	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1044.5	2	5.06	B
64	Myostatin_99_v193	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1036.6	2	5.68	B
65	Myostatin_99_v194	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1072.6	2	6.34	B
66	Myostatin_99_v195	ClAc-	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1080	2	6.27	B
67	Myostatin_99_v196	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-NH2	1108.2	2	6.12	B
68	Myostatin_99_v197	ClAc-	A	S	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1080.6	2	6.26	B
69	Myostatin_99_v198	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeA	MeF	dc		-OH	1129.7	2	6.9	B
70	Myostatin_99_v199	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ade	MeA	MeF	dc		-OH	1115.7	2	6.34	B
71	Myostatin_99_v200	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ade	MeA	MeF	dc		-OH	1108.6	2	5.84	B
72	Myostatin_99_v201	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-OH	1051.9	2	5.03	B
73	Myostatin_99_v207	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Aoc	MeA	MeF	dc		-OH	1058.6	2	5.53	B
74	Myostatin_99_v209	ClAc-	A	A	W	Y	F	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1058.6	2	5.98	B
75	Myostatin_99_v211	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Me3Py	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1066.5	2	4.26	B
76	Myostatin_99_v212	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	F	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1059	2	5.33	B
77	Myostatin_99_v214	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	Me3Py	dc		-OH	1066.5	2	4.14	B
78	Myostatin_99_v215	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	C		-OH	1066	2	5.35	B

[0343]

CUADRO 4-2

79	Myostatin_99_v217	ClAc-	N	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1087.5	2	5.43	B
80	Myostatin_99_v219	ClAc-	A	de	W7N	Y	MeF	I	MeG	F3aao	Y	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1081.5	2	4.92	B
81	Myostatin_99_v226	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	SPent	MeA	MeF	dc		-OH	1066.1	2	4.79	B
82	Myostatin_99_v227	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	HseBu	MeA	MeF	dc		-OH	1066.1	2	4.55	B
83	Myostatin_99_v230	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	HsePr	MeA	MeF	dc		-OH	1059.4	2	4	B
84	Myostatin_99_v244	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	dp	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	806.3	3	4.66	B
85	Myostatin_99_v248	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	dp	KCOpipzaa	F4COO	R	MeCha	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	810.6	3	5.47	B
86	Myostatin_99_v249	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	MeG	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	797.3	3	5.23	B
87	Myostatin_99_v253	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1173.7	2	5.88	B
88	Myostatin_99_v254	ClAc-	A	de	W	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1170.7	2	5.75	B
89	Myostatin_99_v255	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1160.7	2	5.95	B
90	Myostatin_99_v221	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1128.6	2	5	B
91	Myostatin_99_v261	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1174.9	2	5.21	B
92	Myostatin_99_v265	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1178.8	2	5.28	B
93	Myostatin_99_v298	ClAc-	A	A	W	YBn	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1173.8	2	5.47	B
94	Myostatin_99_v309	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1191.9	2	5.22	B
95	Myostatin_99_v315	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc	pipAc	-NH2	1156.8	2	5.19	B
96	Myostatin_99_v316	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1163.8	2	5.68	B
97	Myostatin_99_v335	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1191.2	2	6.10	B
98	Myostatin_99_v338	ClAc-	A	A	W6N	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1191.7	2	5.42	B
99	Myostatin_99_v339	ClAc-	A	A	W6N	Y	MeF	I	EtG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1185.7	2	5.24	B
100	Myostatin_99_v341	ClAc-	A	A	W6N	Y	MeF	TMe	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1179.8	2	5.02	B
101	Myostatin_99_v344	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1197.9	2	6.00	B
102	Myostatin_99_v346	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1184.7	2	6.24	B
103	Myostatin_99_v343	ClAc-	A	A	Bph4ms	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1249.3	2	5.72	B
104	Myostatin_99_v372	ClAc-	CrpG	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1168.7	2	6.38	B
105	Myostatin_99_v381	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1192.8	2	5.68	B
106	Myostatin_99_v382	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1205.8	2	6.29	B
107	Myostatin_99_v383	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	EtG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1199.8	2	5.81	B
108	Myostatin_99_v384	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1199.8	2	4.97	B
109	Myostatin_99_v385	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	EtG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1193.8	2	5.03	B
110	Myostatin_Myostatin_000099	ClAc-	A	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1043.6	2	10.66	A
111	Myostatin_000099_01meA	ClAc-	MeA	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1050.4	2	11.35	A
112	Myostatin_000099_15meC	ClAc-	A	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	MeC		-NH2	1050.6	2	12.11	A
113	Myostatin_000099_15dc	ClAc-	A	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-NH2	1043.7	2	12.07	A
114	Myostatin_000099_16Dap	ClAc-	A	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C	Dap	-NH2	1086.5	2	8.53	A
115	Myostatin_000099_02Dap	ClAc-	A	Dap	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1008.6	2	11.66	A
116	Myostatin_000099_16de	ClAc-	A	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C	de	-NH2	1108.2	2	11.29	A
117	Myostatin_000099_02K	ClAc-	A	K	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1029.6	2	11.52	A
118	Myostatin_000099_02E	ClAc-	A	E	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1029.9	2	13.14	A
119	Myostatin_000099_01Dap	ClAc-	Dap	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	1050.9	2	9.47	A
120	Myostatin_000099_01ApG	ClAc-	ApG	R	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C		-NH2	710.5	3	9.47	A

121	Myostatin_000099_02A	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	C					-NH2	1000.9	2	13.11	A
122	Myostatin_99_2da_15dc_NH2	ClAc-	A	da	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1001.1	2	15.12	A
123	Myostatin_99_Variant_06	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	F4COO	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-OH	1051.5	2	13.73	A
124	Myostatin_99_Variant_08	ClAc-	A	Dap	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	Dap				-NH2	1051.7	2	9.35	A
125	Myostatin_99_Variant_09	ClAc-	ApG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	Dap				-NH2	1065.8	2	9.03	A
126	Myostatin_99_Variant_10	ClAc-	A	Dap	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	Dap	Dap			-NH2	1094.8	2	7.61	A
127	Myostatin_99_Variant_11	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	K	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	Dap				-NH2	1026.7	2	8.39	A
128	Myostatin_99_Variant_13	ClAc-	ApG	Dap	W	Y	MeF	I	MeG	Y	Y	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1030.0	2	9.83	A
129	Myostatin_99_Variant_14	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1051.5	2	4.16	B
130	Myostatin_99_Variant_15	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1058.1	2	5.23	B
131	Myostatin_99_Variant_16	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	3Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1029.5	2	4.20	B
132	Myostatin_99_Variant_17	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	4Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1029.5	2	4.08	B
133	Myostatin_99_Variant_18	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1043.6	2	3.94	B
134	Myostatin_99_Variant_20	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1043.5	2	4.70	B
135	Myostatin_99_Variant_21	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1044.0	2	3.77	B
136	Myostatin_99_Variant_22	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	3Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1022.0	2	4.06	B
137	Myostatin_99_Variant_23	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	3Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1022.2	2	4.58	B
138	Myostatin_99_Variant_24	ClAc-	CrpG	A	W7N	3Py6NH2	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1043.7	2	4.69	B
139	Myostatin_99_Variant_25	ClAc-	CrpG	A	W	3Py6NH2	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1043.6	2	4.45	B
140	Myostatin_99_Variant_26	ClAc-	CrpG	A	W	3Py6NH2	MeF	I	MeG	F	3Py	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-NH2	1021.3	2	4.70	B
141	Myostatin_99_v27	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	G	de	G	dk	-OH	1237.3	2	3.77	B
142	Myostatin_99_v28	ClAc-	A	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	G	de	G	dk	-OH	796.3	3	3.82	B
143	Myostatin_99_v29	ClAc-	A	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	G	de	G	dk	-OH	796.6	3	3.15	B
144	Myostatin_99_v30	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	G	de	G	dk	-OH	820.3	3	3.71	B
145	Myostatin_99_v34	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	Y	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	1246.4	2	3.80	B
146	Myostatin_99_v35	ClAc-	A	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	802.2	3	3.71	B
147	Myostatin_99_v36	ClAc-	A	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	802.6	3	3.19	B
148	Myostatin_99_v37	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	826.3	3	3.74	B
149	Myostatin_99_v38	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	826.7	3	3.07	B
150	Myostatin_99_v39	ClAc-	A	E	W7N	Y	MeF	I	MeG	F	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	821.7	3	3.88	B
151	Myostatin_99_v40	ClAc-	A	E	W7N	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc	ds	ds	ds	dk	-OH	822.0	3	3.22	B
152	Myostatin_99_v60	ClAc-	CrpG	A	F42Py	Yph	MeF	I	MeG	F	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-OH	1116.0	2	5.80	B
153	Myostatin_99_v102	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF	I	MeA	F4COO	F4CON	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-OH	1090.6	2	6.07	B
154	Myostatin_99_v113	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeY	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF3Et	dc					-OH	1121.5	2	5.81	B
155	Myostatin_99_v119	ClAc-	CrpG	A	Bph	Y	MeF3Me	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-OH	1106.2	2	6.06	B
156	Myostatin_99_v126	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3OMe	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc					-OH	1080.5	2	5.78	B

[0344]

CUADRO 4-3

157	Myostatin_99_v127	ClAc-	CrpG	A	W7N	Y	MeF	I	MeA	F3OMe	F4aao	R	MeF	L	MeA	MeF	dc		-OH	1081.1	2	4.92	B
158	Myostatin_99_v205	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	3Py	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-OH	1030.1	2	4.90	B
159	Myostatin_99_v206	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-NH2	1051.0	2	5.31	B
160	Myostatin_99_v208	ClAc-	A	A	W6N	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1066.0	2	4.83	B
161	Myostatin_99_v210	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Me4Py	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1066.1	2	4.52	B
162	Myostatin_99_v213	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	Me4Py	dc		-OH	1066.5	2	3.97	B
163	Myostatin_99_v218	ClAc-	A	de	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	4Py	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1073.5	2	4.91	B
164	Myostatin_99_v220	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	C	pipzAc	-OH	1129.1	2	4.64	B
165	Myostatin_99_v222	ClAc-	CrmG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1051.1	2	4.98	B
166	Myostatin_99_v223	ClAc-	MeopG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1058.1	2	5.39	B
167	Myostatin_99_v224	ClAc-	MeeG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1051.1	2	5.31	B
168	Myostatin_99_v225	ClAc-	AcapG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1071.7	2	5.03	B
169	Myostatin_99_v228	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	AhpOMe	MeA	MeF	dc		-OH	1066.5	2	3.80	B
170	Myostatin_99_v232	ClAc-	A4paa	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1099.9	2	4.30	B
171	Myostatin_99_v233	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	A4paa	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1097.5	2	4.69	B
172	Myostatin_99_v235	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeG	4Py	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	A4paa	-NH2	781.2	3	3.93	B
173	Myostatin_99_v240	ClAc-	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-OH	1059.0	2	5.37	B
174	Myostatin_99_v242	ClAc-	CmG	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ahp	MeA	MeF	dc		-OH	1080.4	2	4.70	B
175	Myostatin_99_v247	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	dp	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	820.3	3	5.22	B
176	Myostatin_99_v256	ClAc-	A	de	F41dMeCmm4Pyz	Y	MeCha	I	dp	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	843.3	3	5.22	B
177	Myostatin_99_v258	ClAc-	A	de	W	Y	MeCha	I	EtG	KCOpipzaa	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	804.5	3	5.10	B
178	Myostatin_99_v259	ClAc-	KCOpipzaa	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	839.9	3	5.03	B
179	Myostatin_99_v260	ClAc-	A	dkCOpipzaa	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	840.0	3	5.38	B
180	Myostatin_99_v262	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeKCOpipzaa	MeF	dc	pipzAc	-OH	840.0	3	4.80	B
181	Myostatin_99_v263	ClAc-	KCOpipzaa	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	842.7	3	4.95	B
182	Myostatin_99_v264	ClAc-	A	dkCOpipzaa	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	842.7	3	5.40	B
183	Myostatin_99_v267	ClAc-	KCOpipzaa	A	W	Y	MeF	I	MeG	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	865.6	3	4.57	B
184	Myostatin_99_v268	ClAc-	A	dkCOpipzaa	W	Y	MeF	I	MeG	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ado	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	865.6	3	4.92	B
185	Myostatin_99_v269	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	809.2	3	4.72	B
186	Myostatin_99_v270	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	KCOpipzaa	F4COO	R	Cha	Ado	MeKCOpipzaa	MeF	dc	pipzAc	-OH	865.6	3	4.38	B
187	Myostatin_99_v288	ClAc-	K (- de - cC14COO - OH)	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	904.4	3	6.02	B
188	Myostatin_99_v290	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeK (- de - cC14COO - OH)	MeF	dc	pipzAc	-OH	1356.1	2	5.90	B
189	Myostatin_99_v292	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	K (- de - cC14COO - OH)	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1281.0	2	5.90	B
190	Myostatin_99_v295	ClAc-	K (- de - cC16COO - OH)	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	913.6	3	3.14	C
191	Myostatin_99_v296	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeK (- de - cC16COO - OH)	MeF	dc	pipzAc	-OH	1370	2	3.01	C
192	Myostatin_99_v299	ClAc-	A	A	W	Yae	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	767.2	3	4.22	B
193	Myostatin_99_v300	ClAc-	A	A	W	Nal1	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1145.8	2	5.55	B

194	Myostatin_99_v301	ClAc-	A	A	W	mBph	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1158.8	2	5.9	B
195	Myostatin_99_v302	ClAc-	A	A	W	Y	MeYap	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	777.2	3	3.90	B
196	Myostatin_99_v303	ClAc-	A	A	W	Y	MeA1Ac4pip	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1153.2	2	4.62	B
197	Myostatin_99_v304	ClAc-	A	A	W	Y	MemBph	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1166.8	2	5.53	B
198	Myostatin_99_v305	ClAc-	A	A	W	Y	MeNal1	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1153.8	2	5.14	B
199	Myostatin_99_v306	ClAc-	A	A	W	Y	MeNal2	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1153.9	2	5.00	B
200	Myostatin_99_v307	ClAc-	A	A	W	Y	MeF4OMe	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1143.8	2	4.66	B
201	Myostatin_99_v308	ClAc-	A	A	W	Y	MeF4C	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1146.0	2	4.89	B
202	Myostatin_99_v311	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1157.6	2	4.78	B
203	Myostatin_99_v312	ClAc-	A	A	W1Bn	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1173.6	2	5.60	B
204	Myostatin_99_v313	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipAc	-OH	1128.2	2	5.72	B
205	Myostatin_99_v314	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	Pip4mAc	-OH	1135.1	2	5.83	B
206	Myostatin_99_v318	ClAc-	CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1116.6	2	5.45	B
207	Myostatin_99_v321	ClAc-	CrpG	A	F41dMeCmm4Pyz	Y	MeF	I	MeA	Bph2C	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc		-OH	1211.8	2	2.98	C
208	Myostatin_99_v323	ClAc-	CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	Bph2OMe	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc		-OH	1161.6	2	6.23	B
209	Myostatin_99_v325	ClAc-	A	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	Bph2C	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1183.9	2	5.60	B
210	Myostatin_99_v330	ClAc-	A	A	W1Ph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeE	MemBph	dc	pipzAc	-OH	1240.8	2	6.57	B
211	Myostatin_99_v331	ClAc-	A	A	W1Ph	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MemBph	dc	pipzAc	-OH	1267.9	2	6.48	B
212	Myostatin_99_v332	ClAc-	A	A	W1Ph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeE	MemBph	dc	pipzAc	-OH	1257.9	2	3.62	C
213	Myostatin_99_v333	ClAc-	A	A	W1Ph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	Cha	Ado	MeE	MeF	dc	pipzAc	-OH	1219.7	2	6.60	B
214	Myostatin_99_v334	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	PrG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1192.2	2	6.27	B
215	Myostatin_99_v336	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	EtG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1185.2	2	6.15	B
216	Myostatin_99_v337	ClAc-	A	A	W6N	Y	MeF	I	PrG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1192.7	2	5.38	B
217	Myostatin_99_v340	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	TMe	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1179.3	2	6.14	B
218	Myostatin_99_v342	ClAc-	A	A	Bph4ms	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-OH	1248.8	2	6.58	B
219	Myostatin_99_v345	ClAc-	A	A	Bph4ms	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1255.5	2	6.22	B
220	Myostatin_99_v347	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc	pipAc	-NH2	1190.7	2	6.16	B
221	Myostatin_99_v370	ClAc-	CrpG	A	Bph4ms	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1166.19	2	6.03	B
222	Myostatin_99_v371	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	pBph2aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1146.6	2	6.18	B
223	Myostatin_99_v373	ClAc-	CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	pBph2aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1154.7	2	5.79	B
224	Myostatin_99_v378	ClAc-	CrpG	A	W7Ph3C	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1163.9	2	6.39	B
225	Myostatin_99_v379	ClAc-	CrpG	A	W1Ph4OMe	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1161.6	2	3.38	C
226	Myostatin_99_v380	ClAc-	CrpG	A	W1Ph	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1146.6	2	6.33	B
227	Myostatin_99_v427	ClAc-	A	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	KCOpipzaa	-OH	1214.8	2	4.9	B
228	Myostatin_99_v428	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	KCOpipzaa	-OH	1257.8	2	5.28	B
229	Myostatin_99_v429	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipzAc	-OH	1171.8	2	5.28	B
230	Myostatin_99_v430	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipAc	-OH	1171.3	2	6.03	B
231	Myostatin_99_v431	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1177.79	2	5.94	B
232	Myostatin_99_v432	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	pipAc	-NH2	1170.7	2	5.83	B
233	Myostatin_99_v433	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc	Pic4	-NH2	1163.7	2	5.79	B
234	Myostatin_99_v439	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Medc		-NH2	1115.1	2	5.9	B

[0345]

CUADRO 4-4

235	Myostatin_99_v440	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	MeC		-NH2	1115.2	2	5.55	B
236	Myostatin_99_v441	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dhcy		-OH	1115.7	2	5.74	B
237	Myostatin_99_v442	ClAc-	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Hcy		-OH	1115.6	2	5.92	B
238	Myostatin_99_v358	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1107.1	2	5.26	B
239	Myostatin_99_v367	ClAc-	D(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDab(@)	MeF	dc		-OH	1100.2	2	6.22	B
240	Myostatin_99_v386	ClAc-	D(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1100.2	2	5.23	B
241	Myostatin_99_v393	ClAc-	E(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1115.2	2	4.81	B
242	Myostatin_99_v394	ClAc-	E(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1167.3	2	5.17	B
243	Myostatin_99_v395	ClAc-	E(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeE	MeF	dc		-OH	1144.3	2	4.74	B
244	Myostatin_Myostatin-00002930	ClAc-	MeE(@)	da	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	6.19	B
245	Myostatin_Myostatin-00002934	ClAc-	CeG(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4F	R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		-NH2	1094.6	2	6.14	B
246	Myostatin_99_v407	ClAc-	E(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1292.2	2	6.37	B
247	Myostatin_99_v411	ClAc-	MeE(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ade	MeA	MeF	dc		-NH2	1121.8	2	5.2	B
248	Myostatin_99_v413	ClAc-	CeG(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ade	MeDap(@)	MeF	dc		-NH2	1107.7	2	4.82	B
249	Myostatin_99_v415	ClAc-	MeE(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4OMe	R	MeF4am (@)	Ade	MeA	MeF	dc		-NH2	1114.6	2	5.96	B
250	Myostatin_99_v417	ClAc-	CeG(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4OMe	R	MeF	Ade	MeDap(@)	MeF	dc		-NH2	1100.7	2	5.3	B
251	Myostatin_99_v418	ClAc-	MeopG	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4OMe	R	MeF	Ade	MeA	MeF	dc		-NH2	1102.2	2	5.79	B
252	Myostatin_99_v419	ClAc-	MeE(@)	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ado	MeE	MeF	dc	Pip4mAc	-NH2	1247.2	2	6.08	B
253	Myostatin_99_v421	ClAc-	CeG(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ade	MeDap(@)	MeF	dc		-OH	1108.1	2	5.33	B
254	Myostatin_99_v422	ClAc-	CeG(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		-OH	1166.1	2	5.66	B
255	Myostatin_99_v424	ClAc-	E(@)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1181.2	2	5.07	B
256	Myostatin_99_v425	ClAc-	MeE(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-NH2	1179.7	2	5.9	B
257	Myostatin_99_v426	ClAc-	MeE(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4OMe	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-NH2	1172.6	2	6.53	B
258	Myostatin_99_v363	ClAc-	CeG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		-OH	1100.2	2	6.3	B
259	Myostatin_99_v348	ClAc-	CeG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeK(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1083.3	2	5.4	B
260	Myostatin_99_v349	ClAc-	CrpG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeK(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1090.1	2	5.44	B
261	Myostatin_99_v350	ClAc-	CrpG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeKMe(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1097.1	2	5.55	B
262	Myostatin_99_v351	ClAc-	CrbG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeK(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1097.2	2	5.68	B
263	Myostatin_99_v352	ClAc-	CrpG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	5.56	B
264	Myostatin_99_v353	ClAc-	CeG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am (@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1107.2	2	5.48	B
265	Myostatin_99_v354	ClAc-	K(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeD(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1076.1	2	5.47	B
266	Myostatin_99_v355	ClAc-	KMe(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeD(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1083.1	2	5.52	B
267	Myostatin_99_v356	ClAc-	K(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeE(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1083.2	2	5.64	B
268	Myostatin_99_v357	ClAc-	Hly(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeD(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1083.2	2	5.93	B
269	Myostatin_99_v359	ClAc-	CrpG	ddab(@)	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeD(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1098	2	4.9	B
270	Myostatin_99_v360	ClAc-	CrpG	dorn(@)	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeD(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1105.2	2	5.38	B
271	Myostatin_99_v361	ClAc-	CrpG	ddab(@)	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeE(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1105.1	2	5.63	B
272	Myostatin_99_v364	ClAc-	CrpG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		-OH	1107.2	2	6.02	B
273	Myostatin_99_v365	ClAc-	CeG(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDab(@)	MeF	dc		-OH	1107.2	2	6.06	B
274	Myostatin_99_v366	ClAc-	Dap(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeE(@)	MeF	dc		-OH	1100.1	2	6.24	B

275	Myostatin_99_v368	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeDab(@)	MeF	dc		-OH	1107.2	2	5.79	B
276	Myostatin_99_v369	ClAc-	CrpG	A	W1aa(@)	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeK(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1119.1	2	5.36	B
277	Myostatin_99_v387	ClAc-	Hgl(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	5.51	B
278	Myostatin_99_v388	ClAc-	Orn(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4COO(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1107.1	2	5.33	B
279	Myostatin_99_v389	ClAc-	K(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4COO(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	5.28	B
280	Myostatin_99_v390	ClAc-	Dab(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4COO(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1100.2	2	5.27	B
281	Myostatin_99_v391	ClAc-	KMe(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4COO(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1121.3	2	5.22	B
282	Myostatin_99_v392	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	F4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1100.2	2	5.05	B
283	Myostatin_Myostatin-00002929	ClAc-	MeE(@)	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1114.2	2	5.77	B
284	Myostatin_Myostatin-00002931	ClAc-	E(@)	da	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1107.2	2	5.4	B
285	Myostatin_99_v402	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ade	MeE	MeF	dc		-OH	1136.2	2	4.88	B
286	Myostatin_99_v403	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Aun	MeE	MeF	dc		-OH	1143.2	2	5.13	B
287	Myostatin_99_v404	ClAc-	E(@)	A	W	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ado	MeE	MeF	dc		-OH	1150.2	2	5.63	B
288	Myostatin_99_v414	ClAc-	MeopG	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF	Ade	MeA	MeF	dc		-NH2	1109.1	2	5.76	B
289	Myostatin_99_v420	ClAc-	MeE(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ade	MeA	MeF	dc		-OH	1122	2	5.73	B
290	Myostatin_99_v423	ClAc-	MeE(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aao	F4COO	R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		-OH	1180.1	2	5.87	B
291	Myostatin_99_v434	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	dhgl(@)		-OH	1099.6	2	5.82	B
292	Myostatin_99_v435	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Hgl(@)		-OH	1099.6	2	5.8	B
293	Myostatin_99_v437	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	MeHgl(@)		-OH	1106.6	2	6	B
294	Myostatin_99_v438	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Medhgl(@)		-OH	1106.6	2	6.01	B
295	Myostatin_99_v443	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	MeA		1099.2	2	6	B
296	Myostatin_99_v444	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	Meda		1099.2	2	5.94	B
297	Myostatin_99_v445	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	G		1092.2	2	5.8	B
298	Myostatin_99_v446	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	A	da		1099.2	2	5.93	B
299	Myostatin_99_v447	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	A	MeG		1099.2	2	5.88	B
300	Myostatin_99_v448	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeG		1099.2	2	5.84	B
301	Myostatin_99_v449	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	G		1085.2	2	5.76	B
302	Myostatin_99_v450	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA		1106.2	2	5.88	B
303	Myostatin_99_v451	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	P		1105.2	2	5.86	B
304	Myostatin_99_v452	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	A	G		1092.2	2	5.85	B
305	Myostatin_99_v453	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	A	Meda		1106.2	2	6.26	B
306	Myostatin_99_v454	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	A		1099.2	2	5.93	B
307	Myostatin_99_v455	Covalente	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	MeA		1070.1	2	3.44	C
308	Myostatin_99_v456	Covalente	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA		1077.1	2	7.08	B
309	Myostatin_99_v457	Covalente	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	G	A		1063.2	2	6.1	B
310	Myostatin_99_v458	Covalente	MeA	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeG		1070.2	2	6.22	B
311	Myostatin_99_v459	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Aeoac			1078.7	2	5.7	B
312	Myostatin_99_v460	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	Ape			1077.7	2	5.89	B
313	Myostatin_99_v461	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	MeAeoac			1085.7	2	6.16	B
314	Myostatin_99_v462	Covalente	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aao	F4COO	R	MeF	Ano	MeA	MeF	MeApe			1084.7	2	6.02	B

[0346] El cuadro 4 enlista los péptidos objetivo, las condiciones analíticas, los tiempos de retención y los valores observados en la ESI-MS(+). El término "terminal" indica el grupo funcional C-terminal (en los cuadros, "-OH" indica COOH, y "-NH_2" indica $CO(NH_2)$), y el espacio en blanco indica que no hay grupo funcional alguno presente en el extremo C-terminal. Con respecto a la "ciclización" en los cuadros, las entradas con la descripción "ClAc" indican que la ciclización se logró enlazando el aminoácido en la posición 1, en donde se introdujo un grupo cloroacetilo, con Cys presente en el extremo C-terminal, mientras que la descripción "covalente" indica que el grupo amino N-terminal del aminoácido en la posición 1 está unido al grupo carboxilo C-terminal del aminoácido en la posición 15 o 16. Nótese que, en este caso, (@) indica que el grupo funcional terminal de la cadena lateral está unido al grupo amino del aminoácido en la posición 1. Además, la sección "adicional/enlazador" en los cuadros indica, salvo para SEQ ID NOs: 295-310, un enlazador o aminoácidos adicionales que no están incluidos en la estructura cíclica. Por ejemplo, en Myostatin_99_v31 (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos X1-X15 forma una estructura cíclica, y además se añade una secuencia de aminoácidos G-de-G-dk como enlazador desde el dc del X15 C-terminal.

[0347] Para los péptidos de SEQ ID NOs: 238-290, las cadenas laterales de los residuos de aminoácido marcados con (@) están unidas entre sí para formar una estructura de entrelazamiento.

[0348] Además, para SEQ ID NOs: 187-191, se muestra lo siguiente: en Myostatin_99_v288 (SEQ ID NO: 187), el NH_2 terminal de la cadena lateral de K en la posición 1 está unido al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del de, y cC14COO está unido además desde el grupo amino del de, cuyo extremo es OH. En Myostatin_99_v290 (SEQ ID NO: 188), el NH_2 terminal de la cadena lateral de MeK en la posición 13 está unido al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del de, y cC14COO está unido además desde el grupo amino del de, cuyo extremo es OH. En Myostatin_99_v292 (SEQ ID NO: 189), el NH_2 terminal de la cadena lateral de K en la posición 8 está unido al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del de, y cC14COO está unido además desde el grupo amino del de, cuyo extremo es OH. En Myostatin_99_v295 (SEQ ID NO: 190), el NH_2 terminal de la cadena lateral de K en la posición 1 está unido al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del de, y cC16COO está unido además desde el grupo amino del de, cuyo extremo terminal es OH. En Myostatin_99_v296 (SEQ ID NO: 191), el NH_2 terminal de la cadena lateral de MeK en la posición 13 está unido al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral del de, y cC16COO está unido además desde el grupo amino del de, cuyo extremo terminal es OH.

[0349] Además, a continuación se describen SEQ ID NOs: 291-294. En Myostatin_99_v434 (SEQ ID NO: 291), se forma una estructura cíclica uniendo el grupo amino N-terminal de CrpG en la posición 1 al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral de dhgl en la posición 15, y el grupo carboxilo C-terminal del dhgl en la posición 15 se mantiene no sustituido (-COOH). De forma similar, en los péptidos de SEQ ID NOs: 292-294, se forma una estructura cíclica uniendo el grupo amino N-terminal

de CrpG en la posición 1 al grupo carboxilo terminal de la cadena lateral de uno de dhgl, Hgl, MeHgl o Medhgl en la posición 15, y el grupo carboxilo C-terminal del aminoácido en la posición 15 se mantiene no sustituido (-COOH).

[0350] Además, a continuación, se describen SEQ ID NOs: 295-310. En Myostatin_99_v443 (SEQ ID NO: 295), se forma una estructura cíclica mediante la unión del grupo amino N-terminal de CrpG en la posición 1 al grupo carboxilo C-terminal de MeA en la posición 16, sin incluir aminoácidos adicionales. De forma similar, en los péptidos de SEQ ID NOs: 296-310, se forma una estructura cíclica mediante la unión del grupo amino N-terminal de CrpG o MeA en la posición 1 al grupo carboxilo C-terminal de Meda, G, da, MeG, MeA, P o A en la posición 16.

[0351] Además, a continuación se describen SEQ ID NOs: 310-314. En Myostatin_99_v459 (SEQ ID NO: 311), se forma una estructura cíclica mediante la unión del grupo amino N-terminal de CrpG en la posición 1 al grupo carboxilo C-terminal de Aeoac en la posición 15, sin incluir aminoácidos adicionales. De forma similar, en los péptidos de SEQ ID NOs: 311-314, se forma una estructura cíclica mediante la unión del grupo amino N-terminal de CrpG en la posición 1 al grupo carboxilo C-terminal de Aeoac, Ape, MeAeoac o MeApe en la posición 15.

[0352]

EJEMPLO 3

Evaluación de la actividad *in vitro* mediante el uso de una prueba de gen reportero para la señalización de miostatina en la línea de células HepG2

En este ejemplo, se evaluaron los efectos inhibidores de la miostatina *in vitro* de los péptidos sintetizados en los ejemplos 1 y 2 usando una prueba de gen reportero para la señalización de la miostatina en la línea de células HepG2.

[0353] Procedimiento de evaluación (1)

Se sembró la línea de células HepG2 (HB-8065, ATCC) cultivada en EMEM (055-08975, WAKO Industries) que contenía FBS a 10% (10270106, Gibco) y 50 μg/mL de gentamicina (11980-14, Nacalai Tesque) en placas de 96 cavidades (167008, Thermo) a 2.0 x 10^4 células/cavidad, y se incubaron en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 24 horas. El plásmido pGL3$(CAGA)_{12}$-luc, a saber, un vector de pGL3 (E1751, Promega) que tenía un gen de luciferasa insertado hacia el extremo 3' de una secuencia de promotor con 12 repeticiones CAGA unidas, se añadió a las cavidades junto con un reactivo de transfección (reactivo de transfección de ADN X-treamGENE9, 6365809001, Roche) a una concentración de 0.04 μg/cavidad. La línea de células se cultivó en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 24 horas para la transfección. El medio se desechó y se reemplazó con EMEM que contenía 50 μL/cavidad de albúmina de suero de bovino a 0.1% (A7030, Sigma) y 50 μg/mL de gentamicina, y se incubaron en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 2 horas.

[0354] Se añadió miostatina (788-G8/C, R&D systems) o GDF-11 (1958-GD-G8/CF, R&D systems), de modo que las concentraciones finales fueran las que se enlistan en el cuadro 5.

[0355]

CUADRO 5

	Miostatina	GDF-11
Método A	10 ng/ml	10 ng/ml
Método B	1 ng/ml	1 ng/ml
Método C	1.5 ng/ml	1 ng/ml
Método D	1.5 ng/ml	1.5 ng/ml

[0356] Se añadió una serie de diluciones cuádruples de varios péptidos sintetizados en los ejemplos 1 y 2 para alcanzar concentraciones de 0.006-100 nmoles/L (inhibición de miostatina) y de 0.12-2000 nmoles/L (inhibición de GDF-11). En este momento, se prepararon también cavidades blancas, en las cuales no se añadió miostatina, GDF-11 ni péptido alguno, y se incubaron en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 20 a 24 horas.

[0357] Se removió el medio que contenía a las células, y se añadió una mezcla que contenía PBS (14190144, Thermo) y un substrato cromógeno, el sistema de prueba de luciferasa One-Glo (E6120, Promega) a una relación de 1:1, se añadió a cada cavidad a 100 μL/cavidad. Esto se agitó con un agitador de placas por 5 minutos, y se transfirió a una placa de 384 cavidades (3570, Corning) a un volumen de 20 μL/cavidad.

[0358] La placa se centrifugó a 1,000 xg por 1 minuto, y se midió la señal de luminiscencia (luminiscencia de 700 nm) usando un lector de placas (Envision 2104, PerkinElmer). Con base en los valores medidos, se calcularon los valores de IC50 de los péptidos usando el software Prism 9, GraphPad. El cuadro 6 muestra los resultados.

[0359]

CUADRO 6-1

SEQ ID No.	Nombre del péptido	IC50 (Luciferasa) Miostatina HepG2 (nM)	IC50 (Luciferasa) GDF-11 HepG2 (nM)	Selectividad	Método
3	Myostatin_99_Variant_07	26.2	1047	40	A
4	Myostatin_99_v31	54.7	1342	25	A
5	Myostatin_99_v41	63.7	1631	26	A
6	Myostatin_99_v43	33.2	1993	60	A
7	Myostatin_99_v44	8.4	810	96	A
8	Myostatin_99_v45	12.8	332	26	A
9	Myostatin_99_v46	43.2	1536	36	A
10	Myostatin_99_Variant_20-OH	44.8	2014	45	A
11	Myostatin_99_Variant_21-OH	106.1	4316	41	A
12	Myostatin_99_v83	20.9	3011	144	A
13	Myostatin_99_v84	27.3	3046	112	A
14	Myostatin_99_v85	13.5	3374	250	A
15	Myostatin_99_v86	10.4	1651	159	A
16	Myostatin_99_v91	72.3	7378	102	A
17	Myostatin_99_v92	78.1	3883	50	A
18	Myostatin_99_v96	88.8	26259	296	A
19	Myostatin_99_v107	2.8	466	166	A
20	Myostatin_99_v108	3.6	374	104	A
21	Myostatin_99_v109	25.6	3842	150	A
22	Myostatin_99_v110	9.5	1695	178	A
23	Myostatin_99_v116	5.4	1963	364	A
24	Myostatin_99_v117	1.7	713	419	A
25	Myostatin_99_v118	23.1	4034	175	A
26	Myostatin_99_v123	38.1	7394	194	A
27	Myostatin_99_v124	17.1	2268	133	A
28	Myostatin_99_v135	22.6	3286	145	A
29	Myostatin_99_v144	16.3	2759	169	A
30	Myostatin_99_v145	1.6	414	259	A
31	Myostatin_99_v148	1.5	439	293	A
32	Myostatin_99_v150	1.7	395	232	A
33	Myostatin_99_v153	1.2	267	222	A
34	Myostatin_99_v156	69.0	4811	70	A
35	Myostatin_99_v158	62.0	6456	104	A
36	Myostatin_99_v159	3.9	404	104	A
37	Myostatin_99_v160	3.2	350	109	A
38	Myostatin_99_v161	8.2	1241	151	A
39	Myostatin_99_v162	6.1	90	15	A
40	Myostatin_99_v163	3.6	1004	279	A
41	Myostatin_99_v164	4.2	1343	320	A
42	Myostatin_99_v165	14.0	1240	89	A
43	Myostatin_99_v166	3.5	951	272	A
44	Myostatin_99_v167	4.5	214	48	A

[0360]

CUADRO 6-2

45	Myostatin_99_v168	2.1	119	57	A
46	Myostatin_99_v169	1.2	372	310	A
47	Myostatin_99_v170	3.3	215	65	A
48	Myostatin_99_v171	44.7	909	20	A
49	Myostatin_99_v172	5.1	173	34	A
50	Myostatin_99_v173	5.5	232	42	A
51	Myostatin_99_v174	1.7	226	133	A
52	Myostatin_99_v175	16.4	399	24	A
53	Myostatin_99_v176	17.3	377	22	A
54	Myostatin_99_v178	12.1	250	21	A
55	Myostatin_99_v179	1.5	163	108	A
56	Myostatin_99_v181	4.5	194	43	A
57	Myostatin_99_v182	53.0	1356	26	A
58	Myostatin_99_v184	14.2	1834	129	A
59	Myostatin_99_v186	43.2	935	22	A
60	Myostatin_99_v188	55.4	911	16	A
61	Myostatin_99_v189	6.9	234	34	A
62	Myostatin_99_v191	8.1	283	35	A
63	Myostatin_99_v192	12.1	2060	170	A
64	Myostatin_99_v193	1.0	57	57	A
65	Myostatin_99_v194	1.2	139	116	A
66	Myostatin_99_v195	1.3	255	196	A
67	Myostatin_99_v196	3.4	603	177	A
68	Myostatin_99_v197	3.4	438	129	A
69	Myostatin_99_v198	0.7	90	123	A
70	Myostatin_99_v199	1.2	159	133	A
71	Myostatin_99_v200	1.0	233	233	A
72	Myostatin_99_v201	8.6	2257	262	A
73	Myostatin_99_v207	3.5	270	77	A
74	Myostatin_99_v209	5.4	794	147	A
75	Myostatin_99_v211	1.1	232	211	A
76	Myostatin_99_v212	3.3	278	84	A
77	Myostatin_99_v214	6.6	1324	201	A
78	Myostatin_99_v215	1.9	202	106	A
79	Myostatin_99_v217	3.0	696	232	A
80	Myostatin_99_v219	2.7	313	116	A
81	Myostatin_99_v226	10.2	3992	391	A
82	Myostatin_99_v227	20.8	683	33	A
83	Myostatin_99_v230	57.1	8375	147	A
84	Myostatin_99_v244	17.7	13647	771	A
85	Myostatin_99_v248	21.5	3525	164	A
86	Myostatin_99_v249	0.5	119	237	A
87	Myostatin_99_v253	5.7	2439	428	A

[0361]

CUADRO 6-3

88	Myostatin_99_v254	3.6	3314	921	A
89	Myostatin_99_v255	1.6	191	119	A
3	Myostatin_99_Variant_07	26.2	1047	40	A
30	Myostatin_99_v145	1.6	414	259	A
90	Myostatin_99_v221	0.9	72	80	A
91	Myostatin_99_v261	0.16	29.00	181	B
92	Myostatin_99_v265	0.10	5.30	55	B
93	Myostatin_99_v298	0.11	6.80	62	B
94	Myostatin_99_v309	0.09	25.00	287	B
95	Myostatin_99_v315	0.10	56.81	541.6	B
96	Myostatin_99_v316	0.37	89.70	239.8	B
97	Myostatin_99_v335	0.32	46.65	145.0	B
98	Myostatin_99_v338	0.38	114.30	299.8	B
99	Myostatin_99_v339	0.89	128.20	144.7	B
100	Myostatin_99_v341	0.76	131.90	173.9	B
101	Myostatin_99_v344	0.08	62.30	812.6	do
102	Myostatin_99_v346	0.09	10.49	116.0	do
103	Myostatin_99_v343	0.10	14.29	137.1	do
104	Myostatin_99_v372	0.09	7.08	76.611	D
105	Myostatin_99_v381	0.05	0.74	16.294	D
106	Myostatin_99_v382	0.04	29.56	711.775	D
107	Myostatin_99_v383	0.18	40.45	220.797	D
108	Myostatin_99_v384	0.04	32.75	805.658	D
109	Myostatin_99_v385	0.17	42.52	251.449	D
238	Myostatin_99_v358	0.17	52.83	310.4	D
239	Myostatin_99_v367	0.15	116.60	757.1	D
240	Myostatin_99_v386	0.19	55.05	294.1	D
241	Myostatin_99_v393	0.12	20.84	181.1	D
242	Myostatin_99_v394	0.06	2.51	43.0	D
243	Myostatin_99_v395	0.34	49.20	144.7	D
244	Myostatin_Myostatin-00002930	2.19	194.00	88.7	D
245	Myostatin_Myostatin-00002934	0.15	23.99	164.2	D
246	Myostatin_99_v407	0.05	2.84	51.8	D
247	Myostatin_99_v411	0.05	5.30	100.0	D
248	Myostatin_99_v413	0.09	9.42	105.1	D
249	Myostatin_99_v415	0.05	2.03	37.3	D
250	Myostatin_99_v417	0.08	6.42	82.2	D
251	Myostatin_99_v418	0.22	29.62	136.2	D
252	Myostatin_99_v419	0.06	22.24	384.0	D
253	Myostatin_99_v421	0.07	5.08	72.9	D
254	Myostatin_99_v422	0.06	30.87	482.9	D
255	Myostatin_99_v424	0.04	15.23	422.5	D
256	Myostatin_99_v425	0.02	4.10	166.3	D
257	Myostatin_99_v426	0.05	8.28	163.5	D
258	Myostatin_99_v363	0.15	57.79	395.0	D

[0362] Procedimiento de evaluación (2): Evaluación mediante pruebas de 2 concentraciones

El plásmido pGL3(CAGA)$_{12}$-luc, a saber, un vector de pGL3 (E1751, Promega), con un gen de luciferasa insertado hacia el extremo 3' de una secuencia de promotor con 12 repeticiones de CAGA unidas, fue transfectado en la línea de células HepG2 (HB-8065, ATCC). El cultivo de la línea de células HepG2 (HB-8065, ATCC) se realizó como se indica en el procedimiento de evaluación (1).

[0363] Se añadió miostatina (788-G8/CF, R&D systems) o GDF-11 (1958-GD-G8/CF, R&D systems) a una concentración final de 10 ng/ml. Varios péptidos sintetizados en los ejemplos 1 y 2 se añadieron a 30 nmoles/l o 100 nmoles/l para la prueba de inhibición de la miostatina o la prueba de inhibición de GDF-11, respectivamente. En este momento, se prepararon también cavidades blanco, en las cuales no se añadió miostatina, GDF-11 ni péptido alguno, y se incubaron en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 20 a 24 horas.

[0364] Se removió el medio que contenía las células, y se añadió a cada cavidad una mezcla que contenía PBS (14190144, Thermo) y un substrato cromógeno, el sistema de prueba de luciferasa One-Glo (E6120, Promega) a una relación de 1:1 a cada cavidad a 100 µL/cavidad. Esto se agitó con un agitador de placas por 5 minutos, y se transfirió a una placa de 384 cavidades (3570, Corning) a un volumen de 20 µL/cavidad.

[0365] La placa se centrifugó a 1,000 xg por 1 minuto, y se midió la señal de luminiscencia (luminiscencia de 700 nm) usando un lector de placas (Envision 2104, PerkinElmer). Con base en los resultados de la medición, se calculó la tasa de inhibición para cada concentración del péptido. El cuadro 7 muestra los resultados.

[0366]

CUADRO 7-1

SEQ ID No.	Nombre del péptido	Inhibición de la miostatina		Inhibición de GDF11	
		30 nM	100 nM	30 nM	100 nM
110	Myostatin_Myostatin_000099	56%	87%	0%	19%
111	Myostatin_000099_01meA	55%	82%	0%	0%
112	Myostatin_000099_15meC	50%	75%	0%	4%
113	Myostatin_000099_15dc	69%	89%	0%	12%
114	Myostatin_000099_16Dap	56%	83%	0%	11%
115	Myostatin_000099_02Dap	50%	82%	0%	2%
116	Myostatin_000099_16de	50%	82%	0%	3%
117	Myostatin_000099_02K	35%	73%	0%	0%
118	Myostatin_000099_02E	58%	83%	0%	9%
119	Myostatin_000099_01Dap	18%	62%	0%	0%
120	Myostatin_000099_01ApG	19%	65%	0%	0%
121	Myostatin_000099_02A	64%	89%	0%	5%
122	Myostatin_99_2da_15dc_NH2	94%	98%	15%	48%
123	Myostatin_99_Variant_06	40%	65%	0%	0%
124	Myostatin_99_Variant_08	72%	92%	7%	22%
125	Myostatin_99_Variant_09	65%	90%	0%	11%
126	Myostatin_99_Variant_10	60%	89%	11%	29%
127	Myostatin_99_Variant_11	75%	94%	22%	26%
128	Myostatin_99_Variant_13	51%	76%	8%	12%
129	Myostatin_99_Variant_14	41%	73%	0%	1%
130	Myostatin_99_Variant_15	54%	84%	0%	0%
131	Myostatin_99_Variant_16	34%	75%	0%	4%
132	Myostatin_99_Variant_17	37%	72%	0%	14%
133	Myostatin_99_Variant_18	56%	80%	0%	0%
134	Myostatin_99_Variant_20	62%	89%	0%	0%
135	Myostatin_99_Variant_21	40%	76%	0%	0%
136	Myostatin_99_Variant_22	45%	72%	0%	0%
137	Myostatin_99_Variant_23	32%	71%	0%	0%
138	Myostatin_99_Variant_24	1%	54%	0%	0%
139	Myostatin_99_Variant_25	20%	50%	0%	0%
140	Myostatin_99_Variant_26	26%	50%	0%	0%
141	Myostatin_99_v27	24%	54%	0%	0%
142	Myostatin_99_v28	69%	92%	0%	20%
143	Myostatin_99_v29	57%	81%	0%	0%
144	Myostatin_99_v30	31%	60%	0%	0%
145	Myostatin_99_v34	65%	89%	0%	32%
146	Myostatin_99_v35	95%	100%	13%	36%
147	Myostatin_99_v36	92%	98%	2%	18%
148	Myostatin_99_v37	69%	88%	0%	0%
149	Myostatin_99_v38	40%	80%	0%	11%
150	Myostatin_99_v39	39%	79%	0%	11%
151	Myostatin_99_v40	39%	67%	0%	0%
152	Myostatin_99_v60	25%	51%	7%	5%

153	Myostatin_99_v102	60%	81%	0%	0%
154	Myostatin_99_v113	35%	70%	0%	0%

[0367]

CUADRO 7-2

155	Myostatin_99_v119	46%	70%	0%	0%
156	Myostatin_99_v126	28%	68%	0%	0%
157	Myostatin_99_v127	31%	57%	0%	0%
158	Myostatin_99_v205	37%	69%	6%	1%
159	Myostatin_99_v206	88%	97%	0%	0%
160	Myostatin_99_v208	98%	100%	0%	20%
161	Myostatin_99_v210	95%	99%	0%	7%
162	Myostatin_99_v213	90%	98%	0%	0%
163	Myostatin_99_v218	44%	74%	0%	0%
164	Myostatin_99_v220	95%	99%	0%	5%
165	Myostatin_99_v222	93%	99%	0%	8%
166	Myostatin_99_v223	94%	99%	0%	28%
167	Myostatin_99_v224	96%	99%	0%	0%
168	Myostatin_99_v225	94%	99%	0%	3%
169	Myostatin_99_v228	19%	60%	4%	0%
170	Myostatin_99_v232	58%	84%	0%	0%
171	Myostatin_99_v233	50%	85%	8%	0%
172	Myostatin_99_v235	91%	99%	0%	0%
173	Myostatin_99_v240	69%	91%	0%	0%
174	Myostatin_99_v242	18%	58%	0%	0%
175	Myostatin_99_v247	68%	94%	0%	6%
176	Myostatin_99_v256	57%	88%	0%	4%
177	Myostatin_99_v258	21%	61%	0%	0%
178	Myostatin_99_v259	100%	100%	0%	28%
179	Myostatin_99_v260	100%	100%	37%	75%
91	Myostatin_99_v261	26%	72%		
180	Myostatin_99_v262	99%	100%	0%	24%
181	Myostatin_99_v263	100%	100%	8%	56%
182	Myostatin_99_v264	100%	100%	24%	72%
92	Myostatin_99_v265	91%	98%		
183	Myostatin_99_v267	100%	100%	24%	64%
184	Myostatin_99_v268	100%	100%	65%	92%
185	Myostatin_99_v269	100%	100%	3%	59%
186	Myostatin_99_v270	100%	100%	5%	68%
187	Myostatin_99_v288	100%	100%	56%	93%
188	Myostatin_99_v290	100%	100%	66%	94%
189	Myostatin_99_v292	95%	100%	3%	2%
190	Myostatin_99_v295	50%	84%		
191	Myostatin_99_v296	41%	83%		
93	Myostatin_99_v298	100%	100%	12%	55%
192	Myostatin_99_v299	93%	99%	0%	0%
193	Myostatin_99_v300	81%	97%	0%	0%

194	Myostatin_99_v301	93%	99%	0%	0%
195	Myostatin_99_v302	99%	100%	0%	0%
196	Myostatin_99_v303	100%	100%	39%	67%
197	Myostatin_99_v304	74%	88%	0%	0%
198	Myostatin_99_v305	100%	100%	0%	24%

[0368]

CUADRO 7-3

199	Myostatin_99_v306	80%	94%	0%	0%
200	Myostatin_99_v307	89%	98%	0%	12%
201	Myostatin_99_v308	87%	97%	0%	3%
202	Myostatin_99_v311	99%	100%	0%	5%
203	Myostatin_99_v312	98%	100%	0%	6%
204	Myostatin_99_v313	100%	100%	12%	40%
205	Myostatin_99_v314	100%	100%	2%	51%
206	Myostatin_99_v318	100%	100%	0%	19%
207	Myostatin_99_v321	58%	91%	0%	0%
208	Myostatin_99_v323	97%	99%	0%	0%
209	Myostatin_99_v325	100%	100%	49%	86%
210	Myostatin_99_v330	100%	100%	0%	0%
211	Myostatin_99_v331	100%	100%	0%	0%
212	Myostatin_99_v332	100%	100%	0%	0%
213	Myostatin_99_v333	100%	100%	0%	34%
214	Myostatin_99_v334	90%	99%	0%	0%
215	Myostatin_99_v336	99%	100%	0%	0%
216	Myostatin_99_v337	82%	96%	0%	0%
217	Myostatin_99_v340	95%	100%	0%	0%
218	Myostatin_99_v342	100%	100%	0%	47%
219	Myostatin_99_v345	100%	100%	7%	70%
220	Myostatin_99_v347	100%	100%	0%	8%
259	Myostatin_99_v348	61%	88%	0%	0%
260	Myostatin_99_v349	67%	92%	0%	0%
261	Myostatin_99_v350	45%	85%	2%	0%
262	Myostatin_99_v351	90%	98%	0%	0%
263	Myostatin_99_v352	99%	100%	0%	0%
264	Myostatin_99_v353	98%	100%	0%	0%
265	Myostatin_99_v354	98%	100%	0%	0%
266	Myostatin_99_v355	59%	88%	0%	0%
267	Myostatin_99_v356	99%	100%	0%	0%
268	Myostatin_99_v357	98%	100%	0%	0%
269	Myostatin_99_v359	99%	100%	0%	0%
270	Myostatin_99_v360	94%	99%	0%	0%
271	Myostatin_99_v361	96%	99%	0%	0%
272	Myostatin_99_v364	93%	97%	0%	0%
273	Myostatin_99_v365	94%	99%	0%	0%
274	Myostatin_99_v366	99%	100%	0%	0%
275	Myostatin_99_v368	95%	99%	0%	0%

276	Myostatin_99_v369	75%	95%	0%	0%
221	Myostatin_99_v370	100%	100%	0%	0%
222	Myostatin_99_v371	100%	100%	0%	0%
223	Myostatin_99_v373	100%	100%	0%	47%
224	Myostatin_99_v378	99%	100%	0%	0%
225	Myostatin_99_v379	100%	100%	0%	0%
226	Myostatin_99_v380	100%	100%	0%	0%
277	Myostatin_99_v387	100%	100%	0%	0%

[0369]

CUADRO 7-4

278	Myostatin_99_v388	100%	100%	0%	0%
279	Myostatin_99_v389	100%	100%	0%	0%
280	Myostatin_99_v390	99%	100%	0%	0%
281	Myostatin_99_v391	100%	100%	0%	0%
282	Myostatin_99_v392	99%	100%	0%	0%
283	Myostatin_Myostatin-00002929	100%	100%	0%	0%
284	Myostatin_Myostatin-00002931	99%	100%	0%	0%
285	Myostatin_99_v402	99%	100%	0%	0%
286	Myostatin_99_v403	100%	100%	0%	0%
287	Myostatin_99_v404	100%	100%	0%	0%
288	Myostatin_99_v414	100%	100%	0%	44%
289	Myostatin_99_v420	100%	100%	0%	25%
290	Myostatin_99_v423	100%	100%	0%	0%
227	Myostatin_99_v427	98%	100%	0%	0%
228	Myostatin_99_v428	96%	99%	0%	0%
229	Myostatin_99_v429	100%	100%	0%	0%
230	Myostatin_99_v430	100%	100%	0%	0%
231	Myostatin_99_v431	100%	100%	0%	0%
232	Myostatin_99_v432	100%	100%	0%	0%
233	Myostatin_99_v433	100%	100%	0%	0%
291	Myostatin_99_v434	98%	100%	0%	0%
292	Myostatin_99_v435	99%	100%	0%	0%
293	Myostatin_99_v437	100%	100%	0%	9%
294	Myostatin_99_v438	100%	100%	0%	10%
234	Myostatin_99_v439	100%	100%	2%	36%
235	Myostatin_99_v440	99%	100%	0%	9%
236	Myostatin_99_v441	100%	100%	0%	0%
237	Myostatin_99_v442	100%	100%	0%	0%
295	Myostatin_99_v443	98%	100%	0%	0%
296	Myostatin_99_v444	96%	99%	0%	0%
297	Myostatin_99_v445	99%	100%	0%	0%
298	Myostatin_99_v446	76%	95%	6%	0%
299	Myostatin_99_v447	89%	98%	0%	0%
300	Myostatin_99_v448	100%	100%	0%	0%
301	Myostatin_99_v449	95%	99%	0%	0%
302	Myostatin_99_v450	100%	100%	0%	0%

303	Myostatin_99_v451	99%	100%	0%	0%
304	Myostatin_99_v452	94%	99%	0%	0%
305	Myostatin_99_v453	18%	57%	1%	0%
306	Myostatin_99_v454	100%	100%	0%	0%
307	Myostatin_99_v455	99%	100%	1%	0%
308	Myostatin_99_v456	100%	100%	1%	13%
309	Myostatin_99_v457	100%	100%	0%	5%
310	Myostatin_99_v458	100%	100%	0%	3%
311	Myostatin_99_v459	97%	100%	0%	0%
312	Myostatin_99_v460	94%	100%	0%	0%
313	Myostatin_99_v461	100%	100%	0%	0%
314	Myostatin_99_v462	100%	100%	0%	0%

[0370] Los cuadros 6 y 7 demuestran que todos los péptidos de la presente invención mostraron actividad inhibidora de la miostatina. Además, la actividad inhibidora de GDF-11 por cada péptido de la presente invención fue menor que la actividad inhibidora de la miostatina.

[0371]

EJEMPLO 4

Evaluación de la actividad *in vitro* mediante el uso de la prueba del gen reportero para la señalización de la miostatina en células de TGF-β HEK-Blue (marca registrada)

En este ejemplo, se evaluó la actividad *in vitro* del péptido Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) usando una prueba de gen reportero para la señalización de la miostatina.

[0372] Se cultivaron células de TGF-β HEK-Blue (marca registrada) (hkb-tgfbv2, InvivoGen) en DMEM GlutaMAX de alto contenido de glucosa (10569010, Thermo) que contenía FBS a 10% (FBS QUALIFIED inactivado con calor, 10270-106, Gibco), 50 mg/mL de normocina (ant-nr-05, InvivoGen), 100 mg/mL de zeocina (ant-zn-05, InvivoGen) y 50 µg/mL de gentamicina (11980-14, Nacalai Tesque). Las células de TGF-β HEK-Blue (marca registrada) cultivadas se suspendieron en un medio de prueba que contenía DMEM con alto contenido de glucosa, GlutaMAX, 50 µg/ml de gentamicina y albúmina de suero de bovino a 1% (A7030, Sigma). Las células se sembraron a 4 x 10^4 células/cavidad en una placa de 96 cavidades (356461, Corning), a saber, una placa de cavidades múltiples de poli-D-lisina de BioCoat, y se dejaron reposar por 30 minutos.

[0373] Una serie de diluciones de 4 veces del péptido, a saber, Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30), sintetizado de acuerdo con el ejemplo 1, cuya concentración final fue de 0.006 nmoles/L hasta una concentración máxima de 0.1 µmoles/L para la prueba de actividad inhibidora de la miostatina, se añadió a una microplaca de no unión de 96 cavidades de fondo en U (650901, Greiner). Para la prueba de actividad inhibidora de GDF-11 o activina A, se añadió una serie de diluciones de 4 veces, cuya concentración final fue de 0.12 nmoles/L hasta una concentración máxima de 2 µmoles/L, a una microplaca de no unión de 96 cavidades de fondo en U (650901, Greiner).

[0374] Posteriormente, se añadió cada una de miostatina (788-G8/CF, R&D systems), GDF-11 (1958-GD-G8/CF, R&D systems) o activina A (338-AC-010/CF, R&D systems) a una concentración final de 3 ng/mL. La placa se selló con Parafilm, y se incubó en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 30 minutos. Las muestras se añadieron a 50 μL/cavidad a una placa que contenía células de TGF-β HEK-Blue (marca registrada), y se incubaron en una incubadora de CO_2 (37°C, CO_2 a 5%) por 24 horas.

[0375] A cada cavidad de una placa de 96 cavidades transparente UV-Star (655801, Greiner), se dispensaron 180 μL de regulador de pH de detección (preparado mediante dilución con 17.64 mL de agua destilada, 180 μL de regulador de pH QUANTI-Blue y 180 μL de solución QUANTI-Blue). En este caso, se transfirieron 20 μL del sobrenadante del medio de cultivo al regulador de pH de detección mencionado anteriormente, y se agitaron con un agitador por 1 minuto. La placa se cubrió y se incubó en una incubadora de CO_2 por 3 a 5 horas, y se midió la absorbancia (Envision 2104, PerkinElmer, 620 nm/pb 40 nm). Con base en la absorbancia, se calcularon los valores de IC50 del péptido usando el software Prism 9, GraphPad. El cuadro 8 y la figura 1 muestran los resultados.

[0376]

CUADRO 8

IC_{50} e IC_{90} del péptido v145 contra miostatina, GDF11 y activina A

	IC50 (nmoles/L)	IC90 (nmoles/L)
Miostatina	0.23	0.64
GDF11	61.18	701.73
Activina A	>20,000	>20,000
Selectividad (GDF11/miostatina)	270	1,088

[0377] Los resultados del cuadro 8 y la figura 1 han demostrado que el péptido de la presente invención exhibió actividad inhibidora de la miostatina, y que la actividad inhibidora de GDF-11 fue menor que la actividad inhibidora de la miostatina.

[0378]

EJEMPLO 5

Distribución del péptido en el músculo esquelético

En este ejemplo, se examinó la distribución del péptido Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3) en el músculo esquelético.

[0379] El péptido Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3), sintetizado de acuerdo con el ejemplo 1, se administró por vía subcutánea a 10 mg/kg a ratones CD1 machos de 6 a 8 semanas de edad. Se midieron las concentraciones en el plasma y en el cuadriceps a las 24, 48 y 72 horas después de la

administración. El cuadro 9 muestra los resultados.

[0380]

CUADRO 9

Péptido Myostatin_99_Variant_07 administrado en el plasma y el tejido muscular

Tiempo después de la administración (hr)	Concentración en plasma (ng/mL)	Concentración intramuscular (ng/mL)
24	232	283
48	55	190
72	40	74

[0381] Se observó que el péptido se distribuía en el tejido muscular a mayor concentración que en el plasma en todos los puntos de tiempo. Nótese que el plasma se separó de la sangre mediante centrifugación; se preparó un homogeneizado de tejido al 25%, y se desproteinizó con acetonitrilo que contenía ácido fórmico a 5%; y las concentraciones del fármaco se determinaron usando un sistema de LC/MS/MS (LCMS-8060, Shimadzu Corporation).

[0382]

EJEMPLO 6

Efecto inhibidor de la miostatina *in vivo* en ratones de tipo silvestre

En este ejemplo, se evaluaron los efectos inhibidores de la señalización de la miostatina *in vivo* de varios péptidos sintetizados de acuerdo con los ejemplos 1 o 2.

[0383] Se usaron ratones macho DBA/2NCrl de cuatro semanas de edad (Jackson Laboratory Japan Inc.). Los ratones fueron criados en grupos de 5 ratones por jaula, y alimentados *ad libitum* (a voluntad) con CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.) y agua corriente. Cada péptido, como se muestra en el cuadro 10, se administró por vía subcutánea diariamente por 14 días, y se midió el peso corporal de los ratones de cada grupo. El peso corporal se pesó diariamente con una balanza electrónica, comenzando el día anterior a la administración.

[0384]

CUADRO 10

Configuración de los grupos

Grupo	Sustancia de prueba	Dosis [mg/kg]	Volumen [mL/kg]	Vía	Frecuencia de dosificación	Número de dosis	Número de ratones
1	PBS	-	10	Subcutánea	Una vez al día	14	5
2	Myostatin_99_Variant_07	1					5
3	Myostatin_99_Variant_07	3					5
4	Myostatin_99_v194	0.1					5

5	Myostatin_99_v194	0.3					5
6	Myostatin_99_v194	1					5
7	Myostatin_99_v145	0.3					5
8	Myostatin_99_v145	1					5
9	Myostatin_99_v145	3					5
10	Myostatin_99_v145	10					5
11	Myostatin_99_v148	0.1					5
12	Myostatin_99_v148	0.3					5
13	Myostatin_99_v200	10					5

[0385] La figura 2 muestra el cambio en el transcurso del tiempo del peso corporal. Nótese que para la media $\pm$ error estándar, * indica: $P < 0.05$, ** indica: $P < 0.01$ vs. PBS, prueba t de Student.

[0386] En la figura 2, v07 representa los resultados de la evaluación de Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3), v194 representa los de Myostatin_99_v194 (SEQ ID NO: 65), v145 representa los de Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30), v148 representa los de Myostatin_99_v148 (SEQ ID NO: 31), y v200 representa los de Myostatin_99_v200 (SEQ ID NO: 71).

[0387] Como se muestra en la figura 2, se encontró que todos los péptidos exhiben un aumento de peso dependiente de la dosis, salvo v200, que se examinó usando sólo una dosis. Se verificó el efecto inhibidor de la miostatina *in vivo* de cada péptido de la presente invención.

[0388]

EJEMPLO 7

Efecto del péptido sobre la mejora de la fuerza muscular y la inhibición de la necrosis muscular en ratones B10 mdx

En este ejemplo, se evaluó el efecto del péptido Myostatin_99_Variant_07 (SEQ ID NO: 3), sintetizado de acuerdo con el ejemplo 1, sobre la mejora de la fuerza muscular en ratones modelo DMD usando ratones modelo B10 mdx (NPL 17).

[0389] A ratones macho C57BL/10-mdx/Jcl (CLEA Japan, Inc.) de cinco semanas de edad, se les administró por vía subcutánea el péptido o control de solvente (vehículo) PBS como se muestra en el cuadro 11, tres veces por semana o todos los días por 5 semanas.

[0390]

CUADRO 11

Configuración de los grupos

Grupo	Sustancia de prueba	Dosis [mg/kg]	Volumen [mL/kg]	Vía	Frecuencia de dosificación	Número de dosis	Número de ratones
1	PBS	-	5	Subcutánea	Una vez al día	21	10
2	Myostatin_99_Variant_07	10			3 veces por semana	9	10

[0391] Usando un medidor de fuerza de agarre inteligente para ratas y ratones (MK-380V; Muromachi Kikai Co., Ltd.), se midieron la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y posteriores, así como el peso corporal, el día de finalización del período de aclimatación (día de agrupamiento) y los días 7, 14, 21, 27 y 33. Las mediciones se hicieron con números de identificación individuales a ciegas, de modo que el examinador desconociera las condiciones de prueba de los ratones. La fuerza de agarre se midió siete veces consecutivas, y el promedio de cinco puntos, excluyendo los dos puntos: el valor máximo y el mínimo, se usó como dato individual. El peso corporal se pesó con una balanza electrónica.

[0392] La figura 3 muestra el cambio en el transcurso del tiempo de la fuerza de agarre. Nótese que v07 en la figura indica el resultado de la evaluación de Myostatin_99_Variant_07; y para la media ± error estándar, * indica: $P < 0.05$, ** indica: $P < 0.01$ vs. PBS, prueba t de Student. En el grupo de administración del péptido Myostatin_99_Variant_07, se observó un aumento continuo en la fuerza de agarre en comparación con el grupo de administración de PBS.

[0393] La figura 4 muestra el cambio en el transcurso del tiempo, del peso corporal. Nótese que para la media ± error estándar, * indica: $P < 0.05$ vs. PBS, prueba t de Student. Se observó que la administración del péptido Myostatin_99_Variant_07 causó un aumento continuo del peso corporal en comparación con el grupo de administración de vehículo.

[0394] Se examinaron también las concentraciones en suero de creatina cinasa (CK) (media ± SEM) del día 35, cuando se sacrificó a los animales. El grupo de control de vehículo fue de 3,836 ± 754 UI/L, y el grupo v07 fue de 3,247 ± 558 UI/L. Por lo tanto, se observó una tendencia hacia concentraciones más bajas de CK cuando se administró v07, lo que sugiere un efecto inhibidor sobre la necrosis del músculo esquelético.

[0395]

EJEMPLO 8

Efecto del péptido administrado por vía subcutánea sobre la mejora de la fuerza muscular en ratones DBA/2 mdx

En este ejemplo, se evaluó el efecto del péptido Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) sobre la mejora de la fuerza muscular en ratones modelo DMD. En este ejemplo, se usaron ratones modelo DBA/2 mdx (NPLs 18 y 19), que exhiben una función muscular más severamente reducida que los ratones B10 mdx documentados en el ejemplo 7.

[0396] A ratones hembra DBA/2N-mdx de veinte semanas de edad (Central Institute for Experimental Medicine and Life Science), se les administró por vía subcutánea Myostatin_99_v145 o un control de solvente (PBS) una vez por semana por 4 semanas como se muestra en el cuadro 12. Como ejemplo comparativo, se administró una sola dosis intravenosa de anticuerpo anti-miostatina latente (GYM329-BS).

[0397]

CUADRO 12

Configuración de los grupos

Grupo	Sustancia de prueba	Dosis [mg/kg]	Volumen [mL/kg]	Vía	Frecuencia de dosificación	Número de dosis	Número de ratones
1	PBS	-	5	Subcutánea	Una vez a la semana	4	9
2	Myostatin_99_v145	1					8
3		3					8
4	GYM329-BS	10	1.3	Intravenosa	Una vez al mes	1	8

[0398] Usando un medidor de fuerza de agarre inteligente para ratas y ratones (MK-380V; Muromachi Kikai Co., Ltd.), se midieron las fuerzas de agarre de las extremidades anteriores y posteriores el día de finalización del período de aclimatación (día de agrupación) y los días 7, 14, 21 y 26. Las mediciones se hicieron con números de identificación individuales ocultos, de modo que el examinador desconociera las condiciones de prueba de los ratones. La fuerza de agarre se midió siete veces consecutivas, y se usó como dato individual el promedio de cinco puntos, excluyendo los valores máximo y mínimo.

[0399] La figura 5 muestra el cambio en el transcurso del tiempo, en la fuerza de agarre. Nótese que para la media $\pm$ error estándar, * indica: $P < 0.05$, ** indica: $P < 0.01$ vs. PBS, prueba t de Student. En el grupo de administración de Myostatin_99_v145, se observó un aumento continuo en la fuerza de agarre dependiente de la dosis, en comparación con el grupo de administración de PBS. El efecto máximo de Myostatin_99_v145 fue mayor que el de GYM329-BS.

[0400]

EJEMPLO 9

Efecto del péptido administrado por vía oral sobre la mejora de la fuerza muscular en ratones B10-mdx

En este ejemplo, se evaluó el efecto del péptido Myostatin_99_v145 (SEQ ID NO: 30) sobre la mejora de la fuerza muscular cuando el péptido se administró por vía oral a ratones modelo DMD.

[0401] Se usaron ratones B10-mdx como ratones modelo DMD. A ratones hembra C57BL/10-mdx/Jcl de cinco semanas de edad (CLEA Japan, Inc.; NPL 17), se les administró por vía subcutánea el péptido o el control de solvente (vehículo) PBS una vez a la semana por cuatro semanas. Además, el péptido o el control de solvente (Labrasol a 30%/PBS) se administró por vía oral a los ratones modelo DMD una vez a la semana tras el ayuno, un total de cuatro veces.

[0402]

CUADRO 13

Configuración de los grupos

Grupo	Sustancia de prueba	Dosis [mg/kg]	Volumen [mL/kg]	Vía	Frecuencia de dosificación	Número de dosis	Número de ratones
1	Vehículo	-	5 (SC) 10 (PO)	Oral y Subcutánea	Una vez a la semana	4	13
2	Myostatin_99_v145	3					12
3		65					12
4		200					13

[0403] Usando un medidor de fuerza de agarre inteligente para ratas y ratones (MK-380V; Muromachi Kikai Co., Ltd.), se midió la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y posteriores el día de finalización del período de aclimatación (día de agrupación; 5 semanas de edad), así como los días 7 (6 semanas de edad), 14 (7 semanas de edad), 20 (8 semanas de edad) y 27 (9 semanas de edad). Las mediciones se hicieron con números de identificación individuales a ciegas, de modo que el examinador desconociera las condiciones de prueba de los ratones. Se midió la fuerza de agarre siete veces consecutivas, y se usó como dato individual el promedio de cinco puntos, excluyendo los dos puntos: el valor más alto y el más bajo.

[0404] La figura 6 muestra el cambio en el transcurso del tiempo, en la fuerza de agarre. Nótese que para la media $\pm$ error estándar, * indica: $P < 0.05$, ** indica: $P < 0.01$ vs. PBS, prueba t de Student. Incluso en el caso de la administración oral, en el grupo de administración de Myostatin_99_v145, se observó un aumento continuo de la fuerza de agarre dependiente de la dosis, en comparación con el grupo de administración de PBS.

[0405] El cuadro 14 muestra sólo las secuencias de aminoácidos incluidas en los enlazadores o aminoácidos adicionales usados en los ejemplos.

[0406]

CUADRO 14

SEQ ID No.	SEQ
315	G de G dk
316	pipzAc
317	pipAc
318	Pip4mAc
319	Dap
320	De
321	Dap Dap
322	ds ds ds dk
323	A4paa
324	KCOpipzaa
325	Pic4

[0407]

EJEMPLO 10

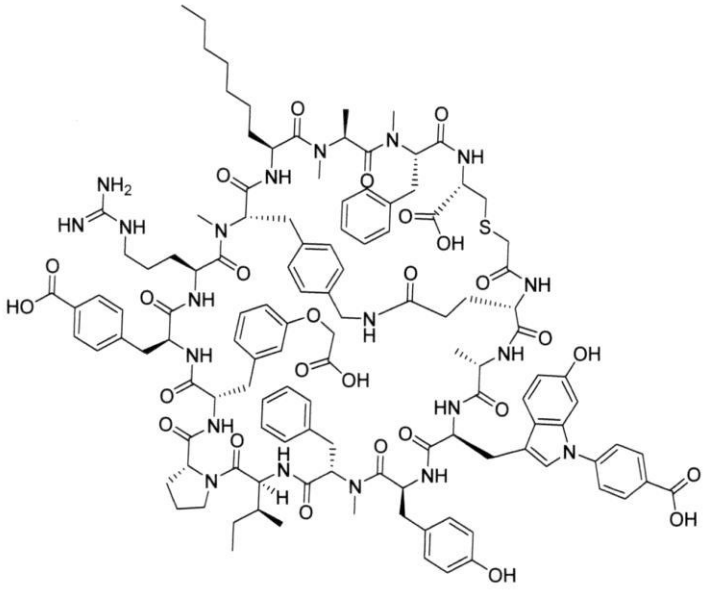
En este ejemplo, se sintetizaron los siguientes péptidos o péptidos unidos a un enlazador.

[0408]

EJEMPLO 10-1

Síntesis de Myostatin_99_v424 (SEQ ID NO: 255)

[0409] [Fórmula química 42]



[0410] A 1 equivalente de la resina Cl-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 0.79 mmoles/g, 5.7 g) hinchada con DCM, se le añadió una solución de DCM que contenía 0.66 equivalentes de Fmoc-dcaa-OtBu y 1.7 equivalentes de DIEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. Se añadió metanol en exceso, y la mezcla se agitó por 10 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. Una porción (0.79 mmoles/g, 1.04 g) de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este caso, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (5.1 equivalentes/9.8 equivalentes/4.9 equivalentes), y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 40°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 7, 10, 12 y 13 a 40°C por 30 minutos. Se usó Fmoc-E(alil)-OH para la reacción del residuo 1, y Fmoc-MeF$_4$am(alloc)-OH para la reacción del residuo 11. Para el residuo 3, se usaron Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH 0.15 M (en NMP)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (3.6 equivalentes/9.8 equivalentes/4.9 equivalentes), y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 40°C. Entonces, la resina se lavó con DMF. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 5 minutos.

[0411] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con

DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (40 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite. Al añadir éter diisopropílico, se produjo un precipitado blanco.

[0412] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. El péptido se disolvió en DMF hasta una concentración final de 1.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; se añadieron 1.1 equivalentes de HATU y 5 equivalentes de DIEA; la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos; y posteriormente se añadió ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0413] La mezcla resultante se disolvió en DMF que contenía HFIP a 3% y 0.02 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$, y se añadieron 20 equivalentes de fenilsilano. La mezcla se agitó por 60 minutos, y entonces se añadió éter diisopropílico. El precipitado resultante se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0414] El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. El péptido se disolvió en DMF hasta una concentración final de 1.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; se añadieron 1.1 equivalentes de HATU y 5 equivalentes de DIEA.; la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos, y entonces se añadió ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite. Al añadir éter diisopropílico, se formó un precipitado blanco. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0415] El sólido resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (20 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT a una relación de volumen de 92.5/2.5/2.5/2.5), y se agitó a 0°C por 20 minutos. El precipitado blanco obtenido por la adición de éter dietílico se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0416] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Agela

Claricep Spherical AQ C18 20-35 μm 100 Å 120 g; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 25°C; gradiente (% de B): 32-32% durante 1 minuto, 32-47% durante 24 minutos, 47-95% durante 10 minutos, 95-95% durante 5 minutos; magnitud de flujo: 10-50 ml/min durante 1 minuto, entonces 50 ml/min). Después de liofilización, el producto se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) CSH C18 5 μm OBD 50 x 250 mm; fase móvil: A = AcOH a 1.0% (en agua), B = AcOH a 1.0% (en MeCN), C = TEAA 0.2 M (en agua), D = acetonitrilo; temperatura: 50°C; gradiente (% de A): 0.1-0.1% durante 5 minutos, 0.1-66.7% durante 0.1 minutos, entonces 100% de B; gradiente (% de B): 0-0% durante 5 minutos, 0-33.3% durante 0.1 minutos, entonces 33.3-34.7% durante 1.9 minutos, entonces 34.7%-34.7% durante 3 minutos, entonces 34.7%-39.8% durante 15.5 minutos, entonces 39.8-60% durante 1.5 minutos, entonces 60-90% durante 4 minutos; gradiente (% de C): 66.6-66.6% durante 5 minutos, 66.6-0% durante 0.1 minutos, entonces 0%; gradiente (% de D): 33.3-33.3% durante 5 minutos, 33.3-0% durante 0.1 minutos, entonces 0%; magnitud de flujo: 20-20 ml/min durante 5.1 minutos, 20-120 ml/min durante 1.9 minutos, entonces 120 mL/min).

[0417] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 95.3%.

[0418] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.07 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

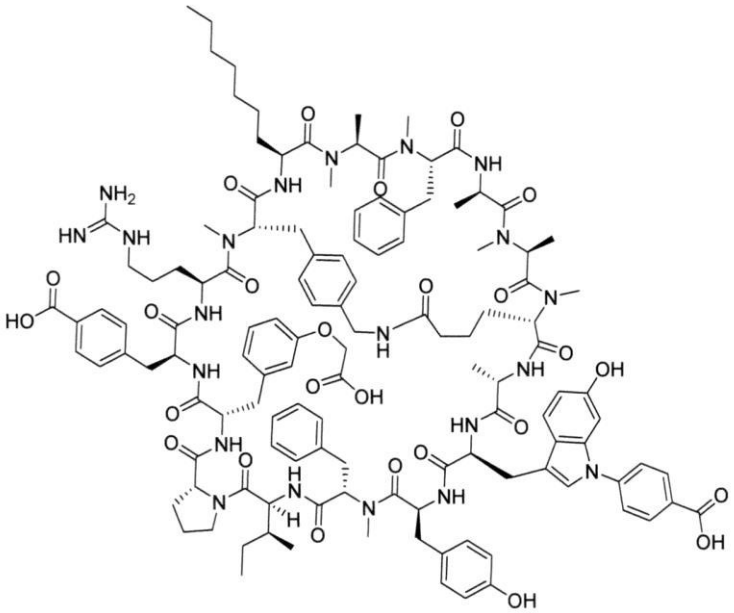
ESI-MS(+): m/z observada = 1181.18 $(M+2H)^{2+}$.

[0419]

EJEMPLO 10-2

Síntesis de Myostatin_99_v490 (SEQ ID NO: 349)

[0420] [Fórmula química 43]



[0421] A 1 equivalente de la resina Cl-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.15 mmoles/g, 2.2 g) hinchada con DCM, se le añadió una solución de DCM que contenía 0.4 equivalentes de Fmoc-da-OH y 1.4 equivalentes de DIEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. Se añadió metanol en exceso, y la mezcla se agitó por 10 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. Una porción (0.46 mmoles/g, 0.22 g) de la resina en fase sólida obtenida se usó para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0422] Para la introducción de cada residuo se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina, y la reacción se llevó a cabo una vez por 15 minutos a 50°C. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 10, 12 y 13 a 50°C por 15 minutos. Se usó Fmoc-MeHgl(alil)-OH para la reacción del residuo 1, y Fmoc-MeF4am(alloc)-OH para la reacción del residuo 11. El Fmoc se removió mediante una reacción dos veces con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 25°C por 1 minuto. Para el residuo 16, se usaron Fmoc-MeA-OH 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8.4

equivalentes), y la reacción se llevó a cabo una vez por 30 minutos a 25°C. Entonces, la resina se lavó con DMF.

[0423] La resina obtenida se suspendió en DCM que contenía HFIP a 1%, y se añadieron 0.2 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 10 equivalentes de fenilsilano. La mezcla se agitó a 25°C por 60 minutos, y se lavó con diclorometano y entonces con DMF, en este orden. La resina en fase sólida resultante se suspendió en DMF y se agitó con 1.2 equivalentes de PyAOP y 3 equivalentes de DIEA a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de lavado con DMF, se removió el grupo Fmoc mediante agitación con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% por 3 minutos a temperatura ambiente.

[0424] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (14 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida. Cuando se añadió entonces éter dietílico/hexano (1/1), se formó un precipitado blanco. El precipitado resultante se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0425] El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. El péptido se disolvió en DMF hasta una concentración final de 1.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; se añadieron 1 equivalente de HATU y 5 equivalentes de DIEA; la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite. La mezcla resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (15 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT/tioanisol a una relación de volumen de 72/4/2/2/20), y se agitó a 25°C por 20 minutos. El precipitado blanco obtenido por la adición de éter dietílico/hexano (1/1) se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0426] El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) CSH Prep C18 5 μm 30 x 150 mm; fase móvil: A = TEAA 50 mM (en agua), B = acetonitrilo; temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 12.1-8.8% durante 0.1 minutos, 8.8-8.8% durante 4.9 minutos, 8.8-12.1% durante 1 minuto, 12.1-37.7% durante 3 minutos, 37.7-42.8%

durante 9 minutos, 42.8-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 44-9 ml/min durante 0.1 minutos, 9-9 ml/min durante 4.9 minutos, 9-44 ml/min durante 1 minuto y, finalmente, 44 ml/min). Después de liofilización, el producto se disolvió en una mezcla de agua/acetonitrilo que contenía TFA a 01% (una mezcla a una relación de volumen de 50/50), y se volvió a liofilizar.

[0427] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 92.9%.

[0428] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 6.04 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

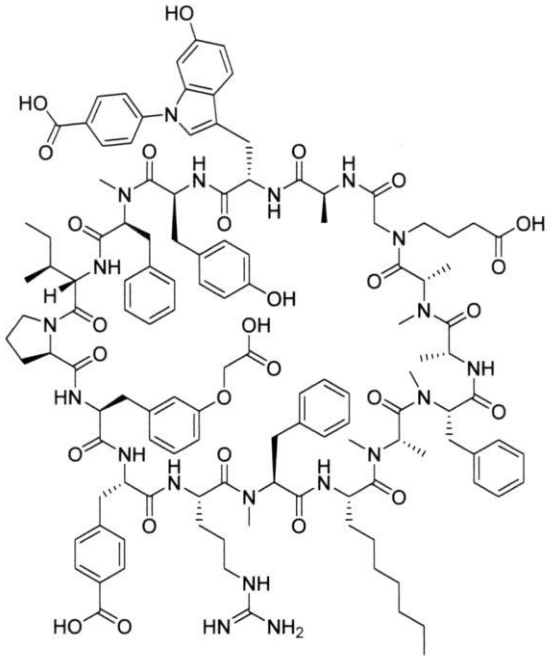
ESI-MS(+): m/z observada = 1192.71 $(M+2H)^{2+}$.

[0429]

EJEMPLO 10-3

Síntesis de Myostatin_99_v482 (SEQ ID NO: 341)

[0430] [Fórmula química 44]



[0431] Se usó la resina HA-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.08 mmoles/g, 0.23 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2

equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina.

[0432] El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. Posteriormente, el péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones que se indican en el cuadro 15 siguiente.

[0433]

CUADRO 15

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
3	15	Fmoc-da-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
5	13	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
12	6	Fmoc-I-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
15	3	Fmoc-W6H(Boc)1 Ph4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces

[0434] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y finalmente se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (10 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para la escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado se concentró bajo presión reducida. Cuando se añadió éter dietílico a la mezcla resultante, se obtuvo un precipitado turbio.

[0435] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y

se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en DMF hasta una concentración final de 7 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1.1 equivalentes de HATU y 5 equivalentes de DIEA; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0436] El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción D (4 mL; una mezcla de TFA/TIS/H_2O/tioanisol a una relación de volumen de 70/2.5/2.5/2.5), y se agitó a temperatura ambiente por 55 minutos. La solución de reacción resultante se añadió a éter dietílico, y se formó un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0437] El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 16-16% durante 2 minutos, 16-41% durante 1 minuto, 41-46% durante 8 minutos, 46-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0438] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 95.0%.

[0439] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.90 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

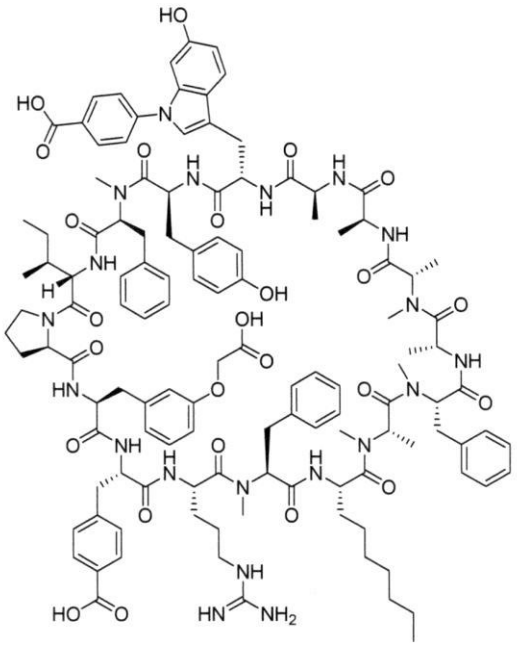
ESI-MS(+): m/z observada = 1180.16 $(M+2H)^{2+}$.

[0440]

EJEMPLO 10-4

Síntesis de Myostatin_99_v483 (SEQ ID NO: 342)

[0441] [Fórmula química 45]



[0442] Se usó la resina HA-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.08 mmoles/g, 0.23 g) para sintetizar el péptido objetivo. La elongación del péptido, la escisión de la resina, la reacción de ciclización y la desprotección, se llevaron a cabo prácticamente de la misma manera que para Myostatin_99_v482.

El producto crudo resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 50 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 19-19% durante 2 minutos, 19-44% durante 1 minuto, 44-49% durante 8 minutos, 49-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 1 minuto, entonces 120 ml/min).

[0443] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 96.0%.

[0444] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 6.13 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

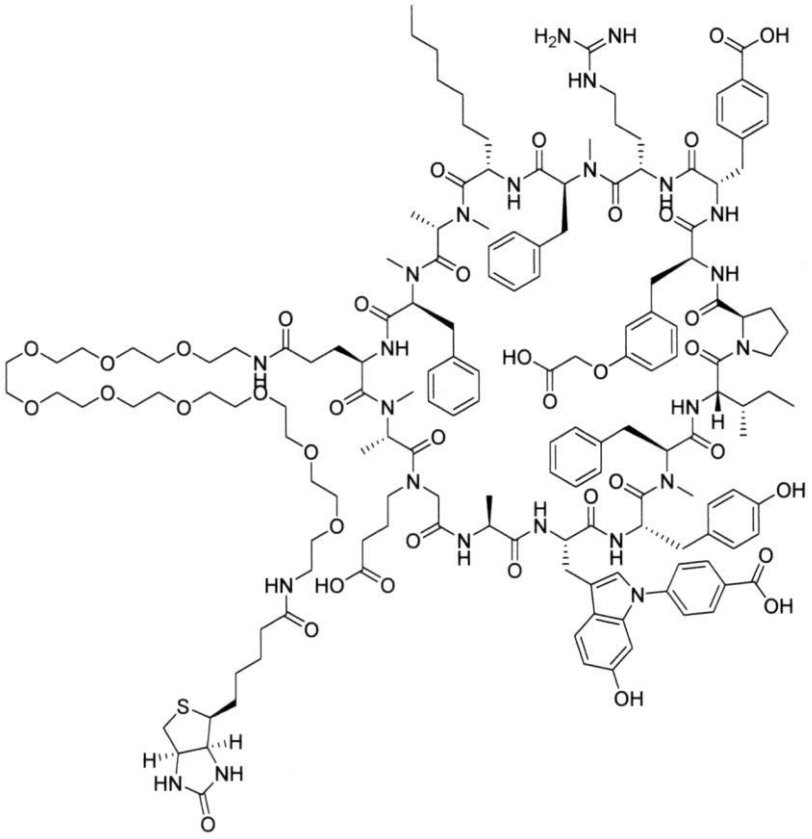
ESI-MS(+): m/z observada = 1144.14 $(M+2H)^{2+}$.

[0445]

EJEMPLO 10-5

Síntesis de Myostatin_99_v482-biotina (SEQ ID NO: 364)

[0446] [Fórmula química 46]



[0447] Se usó la resina HA-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.08 mmoles/g, 0.12 g) para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina.

[0448] El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. Posteriormente, el péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones que se indican en el cuadro 16 siguiente.

[0449]

CUADRO 16

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	1	Fmoc-CrpG(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
3	15	Fmoc-de(alil)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
5	13	Fmoc-MeA-OH	50°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
12	6	Fmoc-I-OH	50°C, 30 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C, 15 min, 1 vez	25°C, 1 min, 2 veces
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C, 15 min, 2 veces	25°C, 1 min, 2 veces
15	3	Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH	50°C, 15 min, 1 vez	-

[0450] La resina en fase sólida resultante se suspendió en DCM, se añadieron 5 equivalentes de Fmoc-OSu, se agitó a 25°C por 1 hora, y entonces se lavó con DMF. La mezcla obtenida se suspendió en DCM, y se añadieron 0.2 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 10 equivalentes de fenilsilano. La mezcla resultante se agitó a 25°C por 60 minutos, se lavó con DMF, y entonces con DCM, en este orden. La resina en fase sólida resultante se suspendió en DMF, y se añadieron 3 equivalentes de Boc-NH-PEG9-NH2, 6 equivalentes de DIC, y 3 equivalentes de Oxima pura. Entonces, la mezcla se agitó por 60 minutos a temperatura ambiente. La resina obtenida para la desprotección del grupo Fmoc se lavó con DMF, y se agitó con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% por 10 minutos a 25°C.

[0451] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (5 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el

recipiente se agitó a 25°C por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se agitó de nuevo con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado se concentró bajo presión reducida. Al añadir éter diisopropílico a la mezcla resultante, se formó un precipitado turbio.

[0452] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se realizó disolviéndolo en DMF hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 1.2 equivalentes de HATU y 3 equivalentes de DIEA; agitando la mezcla a 25°C por 60 minutos; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida con Genevac EZ-II Elite.

[0453] El residuo resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (4 mL; una mezcla de TFA/TIS/H_2O a una relación de volumen de 95/2.5/2.5), y se agitó por 60 minutos a 25°C. La solución de reacción resultante se añadió a éter diisopropílico, y se formó un precipitado. La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida. La mezcla resultante se disolvió en DMSO hasta una concentración final de 25 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; se añadieron 1.1 equivalentes de Biotina-Osu y 5 equivalentes de DIEA; la mezcla se agitó a 25°C por 60 minutos; y entonces se añadió ácido acético para extinguir la reacción.

[0454] La mezcla resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XBridge (marca registrada) C18 5 μm 19 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 13-38% durante 3 minutos, 38-43% durante 8 minutos, 43-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 17 ml/min).

[0455] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 92.9%.

[0456] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.59 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

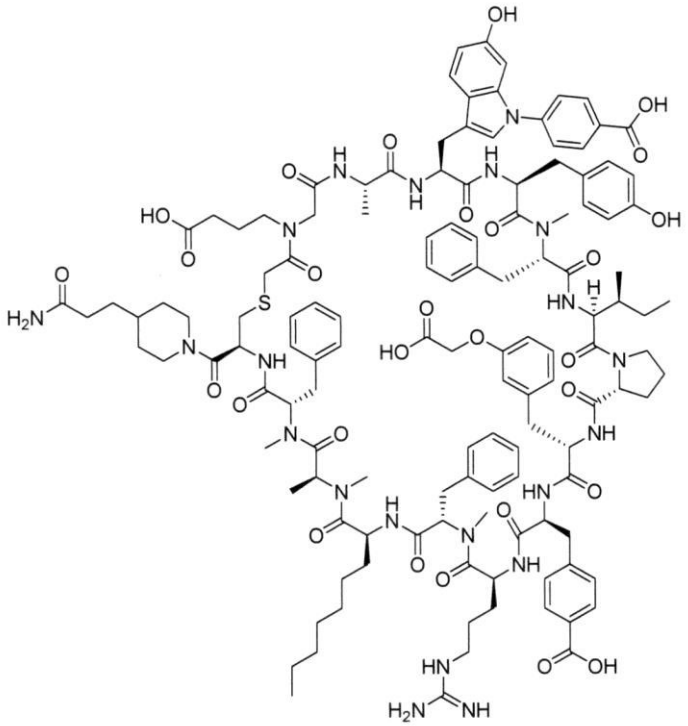
ESI-MS(+): m/z observada = 1028.11 $(M+3H)^{3+}$.

[0457]

EJEMPLO 10-6

Síntesis de Myostatin_99_v488 (SEQ ID NO: 347)

[0458] [Fórmula química 47]



[0459] A 1 equivalente de la resina de amida Sieber (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1 mmol/g, 0.70 g) hinchada con DCM, se añadió una solución de DMF que contenía 4.2 equivalentes de Fmoc-Pip4mAc-OH, 4 equivalentes de HATU y 8 equivalentes de DIEA, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La resina en fase sólida se lavó con DMF, DCM y éter dietílico, y entonces se secó bajo presión reducida. Se usó una porción (0.60 mmoles/g, 0.42 g) de la resina en fase sólida obtenida. Primero se removió el grupo Fmoc usando el método común descrito anteriormente, y entonces se sintetizó el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/HATU 0.5 M (en DMF)/DIEA 1 M (en DMF) (4.2 equivalentes/4 equivalentes/8 equivalentes) por equivalente de resina. La reacción se llevó a cabo una vez a 90°C por 3 minutos. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4 y 13 a 90°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 10 y 15 a 50°C por 15 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para el residuo 12 a 75°C por 30 minutos. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción una vez con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 90°C por 1 minuto. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces

para los residuos 4, 6, 10, 12, 13 y 15 a 25°C por 1 minuto.

[0460] Se introdujo un grupo cloroacetilo de la siguiente manera: se removió el grupo Fmoc del grupo alfa-amino de la resina en fase sólida, sobre la cual se inmovilizó el péptido protegido con Fmoc obtenido en el paso anterior, mediante el procedimiento descrito anteriormente; la resina se suspendió en DMF; se añadieron 5 equivalentes de ácido cloroacético, 5 equivalentes de HATU y 8 equivalentes de DIEA; y la mezcla se agitó a 25°C por 30 minutos.

[0461] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción D (15 mL; una mezcla de TFA/$H)_2$O/TIS/tioanisol a una relación de volumen de 70:2.5:2.5:2.5) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter diisopropílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0462] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La reacción de ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 2.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 4 horas; y entonces añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12.

[0463] La mezcla obtenida se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) CSH Prep C18 5 μm 30 x 150 mm; fase móvil: A = TEAA 50 mM (en agua), B = acetonitrilo; temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 6.0-2.2% durante 0.1 minutos, 2.2-2.2% durante 4.9 minutos, 2.2-6.0% durante 1 minuto, 6.0-31.6% durante 3 minutos, 31.6-36.7% durante 9 minutos, 36.7-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 44-9 ml/min durante 0.1 minutos, 9-9 ml/min durante 4.9 minutos, 9-44 ml/min durante 1 min y, finalmente, 44 ml/min). Después de liofilización, se realizó una nueva purificación bajo las mismas condiciones. Después de la liofilización, el producto se disolvió en una mezcla de agua/acetonitrilo que contenía TFA a 0.1% (una mezcla a una relación de volumen de 50/50), y se liofilizó de nuevo.

[0464] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo

fue del 98.3%.

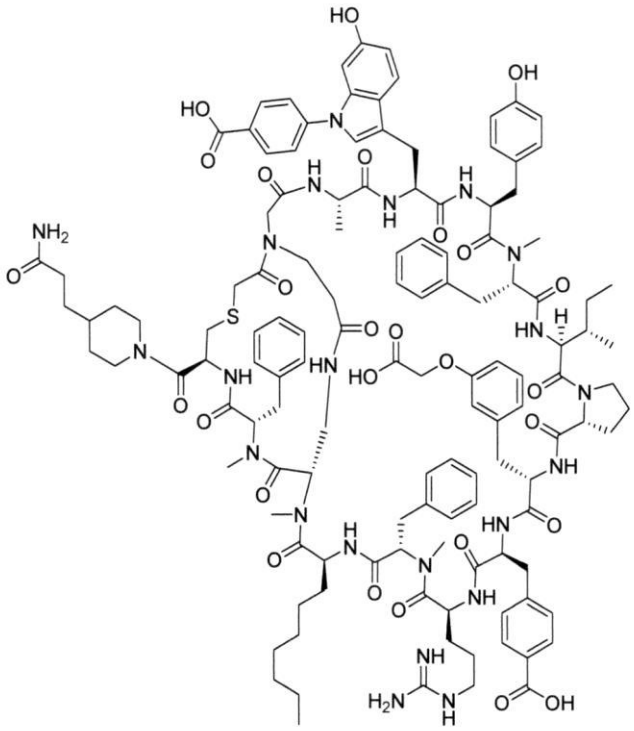
[0465] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.32 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min. ESI-MS(+): m/z observada = 1251.85 $(M+2H)^{2+}$.

[0466]

EJEMPLO 10-7

Síntesis de Myostatin_99_v478 (SEQ ID NO: 337)

[0467] [Fórmula química 48]



[0468] El péptido objetivo se sintetizó mediante el procedimiento general descrito anteriormente, usando la resina de amida Sieber (0.60 mmoles/g, 0.42 g; Watanabe Chemical Industries, LTD.) y removiendo inicialmente el grupo Fmoc. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina. La reacción se llevó a cabo una vez a 90°C por 3 minutos. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4 y 6 a 90°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 10 y

15 a 50°C por 15 minutos. La reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 12 y 13 a 75°C por 30 minutos. Se usó Fmoc-CeG(alil)-OH para la reacción del residuo 1, y Fmoc-MeDap(alloc)-OH para la reacción del residuo 13. Además, el Fmoc se removió mediante una reacción una vez con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% a 90°C por 1 minuto. Mientras tanto, la reacción se llevó a cabo dos veces para los residuos 4, 6, 10, 12, 13 y 15 a 25°C por 1 minuto. La resina en fase sólida resultante se suspendió en DCM, se añadieron 5 equivalentes de Fmoc-OSu, se agitó a 25°C por 1 hora, y entonces se lavó con DMF.

[0469] La resina obtenida se suspendió en DCM que contenía HFIP a 2%, y se añadieron 0.2 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 10 equivalentes de fenilsilano. La mezcla se agitó a 25°C por 60 minutos, y se lavó con DCM y entonces con DMF, en este orden. La resina resultante se suspendió en DMF hasta una concentración final de 25 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida, y se añadieron 1.2 equivalentes de PyAOP y 5 equivalentes de DIEA. La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente por 60 minutos. Después de lavado con DMF, se removió el grupo Fmoc mediante agitación con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% por 10 minutos a temperatura ambiente. La resina resultante se suspendió en DMF, y se añadieron 5.2 equivalentes de ácido cloroacético, 5 equivalentes de HATU y 10 equivalentes de DIEA. La mezcla se agitó a 25°C por 30 minutos. De esta manera, se introdujo el grupo cloroacetilo.

[0470] Para la desprotección de las cadenas laterales y la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida después de la introducción del grupo cloroacetilo se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (15 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/DODT/tioanisol a una relación de volumen de 70/2.5/2.5/5/20) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. Cuando el filtrado se añadió a un exceso de solvente mixto de éter dietílico/hexano (1/1) enfriado hasta 0°C, se produjo un precipitado turbio.

[0471] La mezcla se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y se secó bajo presión reducida. El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. La ciclización del péptido se llevó a cabo disolviéndolo en agua/acetonitrilo (1/1) hasta una concentración final de 5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; añadiendo 10 equivalentes de trietilamina; agitando la mezcla a temperatura ambiente por 60 minutos; y añadiendo ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac EZ-II Elite.

[0472] La mezcla resultante se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) C18 5 μm 19 x 150 mm; fase móvil: A = TFA a 0.1% (en agua), B = TFA a 0.1% (en MeCN); temperatura: 40°C; gradiente (% de B): 36-36% durante 3 minutos, 36-41% durante 8 minutos, 41-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 20-20 mL/min durante 1 minuto, 20-120 mL/min durante 2 minutos, entonces 120 ml/min).

[0473] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 98.7%.

[0474] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.18 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6 μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

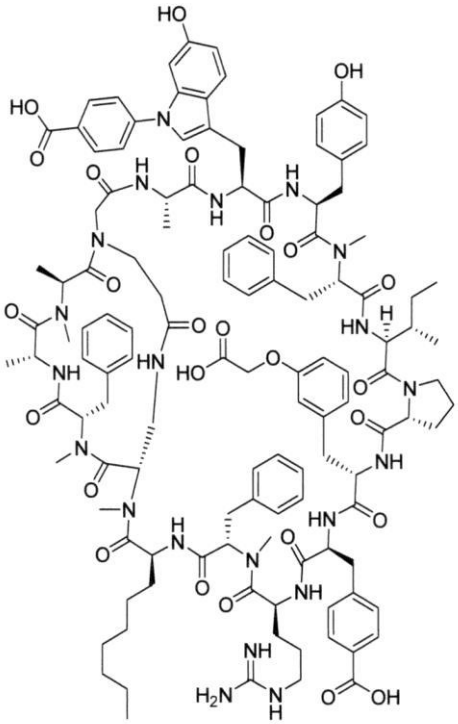
ESI-MS(+): m/z observada = 1243.60 $(M+2H)^{2+}$.

[0475]

EJEMPLO 10-8

Síntesis de Myostatin_99_v489 (SEQ ID NO: 348)

[0476] [Fórmula química 49]



.

[0477] Se usó la resina HA-Trt(2-Cl) (Watanabe Chemical Industries, LTD.; 1.08 mmoles/g, 0.12 g)

para sintetizar el péptido objetivo. En ese momento, se usó Liberty Blue de CEM como sintetizador en fase sólida para la síntesis, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la introducción de cada residuo, se usaron Fmoc-AA 0.21 M (en DMF)/DIC 1 M (en DMF)/Oxima pura 0.5 M (en DMF) (4.2 equivalentes/8 equivalentes/4 equivalentes) por equivalente de resina.

[0478] El grupo Fmoc se desprotegió usando una solución de DMF que contenía 10% de pirrolidina. Posteriormente, el péptido fue elongado de acuerdo con las condiciones que se indican en el cuadro 17 siguiente.

[0479]

CUADRO 17

Orden de introducción en la síntesis en fase sólida	Número de residuo	Fmoc, aminoácido	Condiciones de la reacción de acoplamiento	Condiciones de la desprotección de Fmoc
1	1	Fmoc-CeG(alil)-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
2	16	Fmoc-MeA-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
3	15	Fmoc-da-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
4	14	Fmoc-MeF-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
5	13	Fmoc-MeDap(alloc)-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
6	12	Fmoc-Ano-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
7	11	Fmoc-MeF-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
8	10	Fmoc-R(Pbf)-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
9	9	Fmoc-F4COO(tBu)-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
10	8	Fmoc-F3aao(tBu)-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
11	7	Fmoc-dp-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
12	6	Fmoc-I-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
13	5	Fmoc-MeF-OH	50°C, 20 min, 1 vez	25°C, 5 min, 2 veces
14	4	Fmoc-Y(tBu)-OH	50°C, 20 min, 2 veces	25°C, 5 min, 2 veces
15	3	Fmoc-W6H(Boc)1 Ph4COO(tBu)-OH	50°C, 20 min, 1 vez	-

[0480] La resina en fase sólida resultante se suspendió en DCM, se añadieron 5 equivalentes de Fmoc-OSu, se agitó a 25°C por 1 hora, y entonces se lavó con DMF. La resina obtenida se suspendió en DCM, y se añadieron 0.2 equivalentes de $Pd(PPh_3)_4$ y 20 equivalentes de fenilsilano. La mezcla resultante se agitó a 25°C por 60 minutos, y se lavó con DCM y entonces con DMF, en este orden. La resina resultante se suspendió en DMF hasta una concentración final de 3.5 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida, y se añadieron 1.01 equivalentes de PyAOP y 5 equivalentes de DIEA. La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente por 20 minutos. Después

de lavado con DMF, se removió el grupo Fmoc mediante agitación con una solución de DMF que contenía pirrolidina a 10% por 30 minutos a temperatura ambiente.

[0481] Para la escisión de la resina en fase sólida, la resina obtenida se lavó primero cinco veces con DMF y tres veces con cloruro de metileno, entonces se lavó con éter dietílico, y se secó bajo presión reducida. El coctel de agentes de reacción (10 mL; una mezcla de HFIP/DCM a una relación de volumen de 20/80) se añadió entonces a un recipiente de reacción que contenía la resina en fase sólida, y el recipiente se agitó a temperatura ambiente por 60 minutos. La solución de reacción se recolectó mediante filtración a través de una frita. La resina en fase sólida que quedó en el recipiente de reacción se volvió a agitar con el coctel para su escisión, y el componente de la solución se recolectó de la frita y se mezcló con el filtrado anterior. El filtrado obtenido se concentró bajo presión reducida. Al añadirse éter dietílico, se formó un precipitado blanco. El precipitado resultante se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0482] El sólido (péptido) obtenido se usó en la siguiente reacción de ciclización. El péptido se disolvió en DMF hasta una concentración final de 7 mM, con base en el número de moles de la resina en fase sólida; se añadieron 1.1 equivalentes de HATU y 5 equivalentes de DIEA; la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos; y entonces se añadió ácido acético para extinguir la reacción. La solución de reacción resultante se concentró bajo presión reducida usando Genevac HT-12. La mezcla resultante se disolvió en un coctel de agentes de reacción (12 mL; una mezcla de TFA/H_2O/TIS/tioanisol a una relación de volumen de 70/2.5/2.5/25), y se agitó a 25°C por 35 minutos. El precipitado blanco obtenido por la adición de éter dietílico se centrifugó (a 9000 rpm a 0°C por 2 minutos), y entonces la solución se decantó. El sólido resultante se lavó de nuevo con una pequeña cantidad de éter dietílico enfriado hasta 0°C, y entonces se secó bajo presión reducida.

[0483] El producto crudo obtenido se purificó usando las siguientes condiciones (columna: Waters XSelect (marca registrada) CSH Prep C18 5 μm 30 x 150 mm; fase móvil: A = TEAA 50 mM (en agua), B = acetonitrilo; temperatura: 50°C; gradiente (% de B): 11.1-7.8% durante 0.1 minutos, 7.8-7.8% durante 4.9 minutos, 7.8-11.1% durante 1 minuto, 11.1-36.7% durante 3 minutos, 36.7-41.8% por 9 minutos, 41.8-60% durante 1 minuto; magnitud de flujo: 44-9 ml/min durante 0.1 minutos, 9-9 ml/min durante 4.9 minutos, 9-44 ml/min durante 1 minuto y, finalmente, 44 ml/min. Después de liofilización, el producto se disolvió en una mezcla de agua/acetonitrilo que contenía TFA a 0.1% (una mezcla a una relación de volumen de 50/50), y se volvió a liofilizar.

[0484] La pureza del producto objetivo se calculó a partir de la relación de áreas del cromatograma de LC/MS (longitud de onda UV: 225 nm) bajo condiciones analíticas. La pureza del producto objetivo fue del 94.1%.

[0485] Condiciones analíticas: tiempo de retención = 5.77 minutos; columna: Kinetex EVO C18 2.6

μm 2.1 x 150 mm, 100 Å; fase móvil: A = TFA a 0.025% (en agua), B = TFA a 0.025% (en MeCN); temperatura: 60°C; gradiente (% de concentración de B): 20-60% durante 7.15 minutos, entonces 60-95% durante 0.3 minutos, entonces 95-95% durante 1.55 minutos; magnitud de flujo: 0.5 ml/min.

ESI-MS(+): m/z observada = 1171.75 $(M+2H)^{2+}$.

[0486]

EJEMPLO 11

Análisis del péptido

Los péptidos objetivo se sintetizaron de acuerdo con los métodos comunes descritos anteriormente y los procedimientos de los ejemplos 1, 2 y 10.

[0487]

CUADRO 18

SEQ ID No.	Nombre del péptido	Ciclización	Seq																Adicional/Enlazador	Terminal	m/z	[m+XH]X+	Tiempo de retención	Condiciones analíticas
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16						
326	Myostatin_99_v463	Covalente	@MeE(@R1)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	MeA	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1171.8	2	6.3	B
327	Myostatin_99_v464	Covalente	@MeHgl(@R1)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	MeA	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1178.8	2	6.31	B
328	Myostatin_99_v465	Covalente	@CeG(@R1)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	da	MeA@			1163.8	2	6.03	B
329	Myostatin_99_v466	Covalente	@CrpG(@R1)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	da	MeA@			1170.8	2	6.16	B
330	Myostatin_99_v471	ClAc	A	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1215.8	2	5.42	B
331	Myostatin_99_v472	ClAc	A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeA	MeF	dc			OH	1107.9	2	5.94	B
332	Myostatin_99_v473	ClAc	CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1212.7	2	6	B
333	Myostatin_99_v474	ClAc	CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1178.7	2	5.13	B
334	Myostatin_99_v475	ClAc	E(@)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1250.3	2	5.02	B
335	Myostatin_99_v476	ClAc	E(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1177.5	2	4.7	B
336	Myostatin_99_v477	ClAc	E(@)	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ado	MeA	MeF	dc			OH	1142.2	2	5.54	B
337	Myostatin_99_v478	ClAc	CeG(@)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1243.6	2	5.18	B
338	Myostatin_99_v479	ClAc	CeG(@)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1170.2	2	5.11	B
339	Myostatin_99_v480	Covalente	@CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeA	MeF	da	MeA@			1141.2	2	6.59	B
340	Myostatin_99_v481	Covalente	@CrpG	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1107.2	2	5.39	B
341	Myostatin_99_v482	Covalente	@CrpG	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1180.2	2	5.9	B
342	Myostatin_99_v483	Covalente	@A	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1144.1	2	6.13	B
343	Myostatin_99_v484	Covalente	@A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeE	MeF	da	MeA@			1134.5	2	2.81	C
344	Myostatin_99_v485	Covalente	@A	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1071.3	2	5.69	B
345	Myostatin_99_v486	Covalente	@MeA	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1151.4	2	6.12	B
346	Myostatin_99_v487	Covalente	@MeA	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeE	MeF	da	MeA@			1141.5	2	2.92	C
347	Myostatin_99_v488	ClAc	CrpG	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1251.9	2	5.32	B
348	Myostatin_99_v489	Covalente	@CeG(@R1)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	da	MeA@			1171.8	2	5.77	B
349	Myostatin_99_v490	Covalente	@MeHgl(@R1)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1192.7	2	6.04	B
350	Myostatin_99_v491	Covalente	@Hgl(@R1)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1185.7	2	5.85	B
351	Myostatin_99_v492	Covalente	@CeG(@R1)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	da	MeA@			1098.6	2	5.55	B
352	Myostatin_99_v493	Covalente	@MeHgl(@R1)	A	W6H	Y	MeF	I		F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1119.7	2	5.71	B
353	Myostatin_99_v494	Covalente	@Hgl(@R1)	A	W6H	Y	MeF	I	MeG	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@R1)	Ano	MeA	MeF	da	MeA@			1112.7	2	5.34	B
354	Myostatin_99_v495	Covalente	@CeG(@R1)	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	da	MeA@			1111.7	2	5.78	B
355	Myostatin_99_v382-PEG12KBio	ClAc	A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeE	MeF	dc		Pip4mAcPEG12cKbio	NH2	1122.2	3	5.96	B
356	Myostatin_99_v470-PEG12KBio	ClAc	A	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ado	MeE(Biotin-PEG9NH2)	MeF	dc		Pip4mAc	NH2	1025.8	3	6.16	B
357	Myostatin_99_v145-biotin	ClAc	CrpG	A	W	Y	MeF	I	MeA	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		PEG12c Kbio	NH2	1057.2	3	5.81	B
358	Myostatin_99_v422-biotin	ClAc	CeG(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		PEG12c Kbio	NH2	1095.5	3	5.72	B
359	Myostatin_99_v423-biotin	ClAc	MeE(@)	A	W1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		PEG12c Kbio	NH2	1104.9	3	5.62	B
360	Myostatin_99_v424-biotin	ClAc	E(@)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ano	MeA	MeF	dc		PEG12c Kbio	NH2	1105.5	3	5.2	B
361	Myostatin_99_v471-biotin	ClAc	A	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAcPEG12cKbio	NH2	1129.0	3	5.55	B
362	Myostatin_99_v477-biotin	ClAc	E(@)	A	W6H	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF4am(@)	Ado	MeA	MeF	dc		PEG12c Kbio	NH2	1079.6	3	5.62	B
363	Myostatin_99_v478-biotin	ClAc	CeG(@)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@)	MeF	dc		Pip4mAcPEG12cKbio	NH2	1147.4	3	5.39	B
364	Myostatin_99_v482-biotin	Covalente	@CrpG	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	de(Biotin-PEG9NH2)	MeA@			1028.1	3	5.59	B
365	Myostatin_99_v483-biotin	Covalente	@A	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	de(Biotin-PEG9NH2)	MeA@			1004.1	3	5.7	B
366	Myostatin_99_v486-biotin	Covalente	@MeA	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	de(Biotin-PEG9NH2)	MeA@			1008.8	3	5.8	B
367	Myostatin_99_v488-biotin	ClAc	CrpG	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeA	MeF	dc		Pip4mAcPEG12cKbio	NH2	1152.8	3	5.66	B
368	Myostatin_99_v489-biotin	Covalente	@CeG(@R1)	A	W6H1Ph4COO	Y	MeF	I	dp	F3aaoF4COO		R	MeF	Ano	MeDap(@R1)	MeF	de(Biotin-PEG9NH2)	MeA@			1022.5	3	5.49	B

[0488] El cuadro 18 enlista los péptidos objetivo, las condiciones analíticas, los tiempos de retención y los valores observados en la ESI-MS(+). El término "terminal" indica el grupo funcional C-terminal (en los cuadros, "-OH" u "OH" indica COOH, y "-NH2" o "NH2" indica $CO(NH_2)$), y el espacio en blanco indica que no hay grupo funcional alguno presente en el extremo C-terminal. Con respecto a la "ciclización" en los cuadros, las entradas con la descripción "ClAc" indican que la ciclización se logró enlazando el aminoácido en la posición 1, en donde se introdujo un grupo cloroacetilo, con Cys presente en el extremo C-terminal, mientras que la descripción "covalente" indica que el grupo amino N-terminal del aminoácido en la posición 1 está unido al grupo carboxilo C-terminal del aminoácido en la posición 15 o 16. Además, la sección de "adicional/enlazador" en los cuadros indica un enlazador o aminoácidos adicionales que no están incluidos en la estructura cíclica. Por ejemplo, en Myostatin_99_v31 (SEQ ID NO: 4), la secuencia de aminoácidos X1-X15 forma una estructura cíclica, y una secuencia de aminoácidos G-de-G-dk se añade además como enlazador desde el dc del X15 C-terminal.

[0489] En los péptidos de SEQ ID NOs: 326-329, 334-338, 348-354, 358-360, 362-366 y 368, las cadenas laterales de los residuos de aminoácido con (@), (@R1) indican que las cadenas laterales de los residuos de aminoácido marcados con (@) y (@R1) se unen entre sí para formar una estructura de entrelazamiento, y el grupo amino N-terminal y el grupo carboxi C-terminal de los residuos de aminoácido marcados con @ se unen entre sí para formar una estructura cíclica. Por ejemplo, en Myostatin_99_v463 (SEQ ID NO: 326), el grupo amino N-terminal (@MeE) de MeE en la posición 1 está unido al grupo carboxi C-terminal (MeA@) de MeA en la posición 16 para formar una estructura cíclica, y el grupo carboxi de la cadena lateral (MeE(@R1)) de MeE en la posición 1 está unido al grupo amida de la cadena lateral (MeF4am(@R1)) de MeF4am en la posición 11 para formar una estructura de entrelazamiento. Además, en Myostatin_99_v475 (SEQ ID NO: 334), E en la posición 1 y dc en la posición 15 están unidos para formar una estructura cíclica, y el grupo amida de la cadena lateral (E(@)) de E en la posición 1 y el grupo amida de la cadena lateral (MeF4am(@)) de MeF4am en la posición 11 también están unidos para formar una estructura de entrelazamiento.

[0490] Además, a continuación se describen SEQ ID NOs: 355-368. En Myostatin_99_v382-PEG12KBio (SEQ ID NO: 355), A en la posición 1 está unido a dc en la posición 15 para formar una estructura cíclica; un enlazador adicional (adicional/enlazador), a saber, Pip4 mcAc-PEG12c-K, está unido desde la cadena lateral del dc en la posición 15; además, el grupo carboxi de la biotina está unido al NH_2 terminal de la cadena lateral del K terminal; y además, el OH del grupo carboxi del K terminal es reemplazado por NH_2 ($CONH_2$).

[0491]

EJEMPLO 12

Evaluación de la actividad *in vitro* mediante el uso de una prueba de gen reportero para la señalización de la miostatina en la línea de células HepG2

En este ejemplo, se evaluaron los efectos inhibidores de la miostatina *in vitro* de los péptidos sintetizados en los ejemplos 10 y 11 de acuerdo con el procedimiento de evaluación (1) del ejemplo 3.

El cuadro 19 muestra los resultados.

[0492]

CUADRO 19

SEQ ID No.	Nombre del péptido	IC50 (Luciferasa) Miostatina HepG2 (nM)	IC50 (Luciferasa) GDP-11 HepG2 (nM)	Selectividad	Método
326	Myostatin_99_v463	0.05	2.15	39.4	D
327	Myostatin_99_v464	0.04	2.99	82.1	D
328	Myostatin_99_v465	0.03	31.02	1121.1	D
329	Myostatin_99_v466	0.07	32.66	501.9	D
330	Myostatin_99_v471	0.09	15.24	169.1	D
331	Myostatin_99_v472	1.51	83.83	55.4	D
332	Myostatin_99_v473	0.37	108.80	290.7	D
333	Myostatin_99_v474	1.23	120.30	98.1	D
334	Myostatin_99_v475	0.04	1.78	44.9	D
335	Myostatin_99_v476	0.22	25.31	114.3	D
336	Myostatin_99_v477	0.14	25.69	181.8	D
337	Myostatin_99_v478	0.04	25.52	575.7	D
338	Myostatin_99_v479	0.88	47.49	54.1	D
339	Myostatin_99_v480	0.36	172.20	472.7	D
340	Myostatin_99_v481	0.58	64.04	110.8	D
341	Myostatin_99_v482	0.11	90.17	814.5	D
342	Myostatin_99_v483	0.14	59.94	424.2	D
343	Myostatin_99_v484	0.43	240.40	560.2	D
344	Myostatin_99_v485	2.11	123.90	58.6	D
345	Myostatin_99_v486	0.14	70.82	516.6	D
346	Myostatin_99_v487	0.48	123.90	259.9	D
347	Myostatin_99_v488	0.18	53.16	294.4	D
348	Myostatin_99_v489	0.12	45.41	365.6	D
349	Myostatin_99_v490	0.70	112.00	160.4	D

350	Myostatin_99_v491	0.77	82.22	106.9	D
351	Myostatin_99_v492	0.42	78.61	187.6	D
352	Myostatin_99_v493	0.46	84.09	184.0	D
353	Myostatin_99_v494	0.46	63.86	139.7	D
354	Myostatin_99_v495	0.32	246.60	774.3	D

[0493] El cuadro 19 demuestra que todos los péptidos examinados en este ejemplo exhibieron actividad inhibidora de la miostatina. La actividad inhibidora de GDF-11 de los péptidos examinados en este ejemplo fue menor que la de la miostatina.

[0494]

EJEMPLOS DE REFERENCIA

Para sintetizar aminoácidos no naturales novedosos

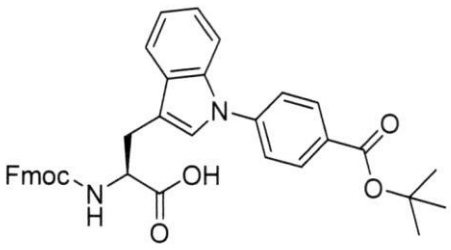
Los ejemplos de referencia muestran ejemplos de síntesis de varios aminoácidos no naturales.

[0495]

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Síntesis de Fmoc-W1Ph4COO(tBu)-OH

[0496] [Fórmula química 50]



[0497] Primero, se disolvió 4-yodobenzoato de ter-butilo (25.0 g, 82.2 mmoles; CAS: 120363-13-5) en DMF (82 mL), y se añadieron 1H-indol (10.6 g, 90.4 mmoles; CAS: 120-72-9), yoduro de cobre(I) (3.1 g, 16.4 mmoles; CAS: 7681-65-4) y carbonato de cesio (40.3 g, 123 mmoles; CAS: 534-17-8) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 120°C por 1 hora. La mezcla se diluyó con una solución acuosa de ácido clorhídrico 0.1 M, y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 100/50 a 0/100).

[0498] A temperatura ambiente, una porción del producto resultante (20.5 g, 69.9 mmoles) se disolvió en DMF (233 mL), y se añadió N-yodosuccinimida (18.9 g, 83.9 mmoles; CAS: 516-12-1). La

mezcla se agitó por 10 minutos. La mezcla de reacción se enfrió en hielo, se mezcló con una solución acuosa de tiosulfato de sodio, y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con agua saturada de bicarbonato de sodio y salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 90/10 a 80/20), para dar 4-(3-yodo-1H-indol-1-il)-benzoato de ter-butilo.

[0499] A temperatura ambiente, se suspendió zinc (1.30 g, 19.9 mmoles; CAS: 7440-66-6) en DMF (13 mL), y se añadieron 1,2-dibromoetano (0.057 mL, 0.665 mmoles; CAS: 106-93-4) y cloruro de trimetilsililo (0.088 mL, 0.665 mmoles; CAS: 75-77-4). La mezcla se agitó a 50°C por 30 minutos. Después de que la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (3.00 g, 6.65 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 hora para preparar un reactivo de organozinc.

[0500] A una solución de DMF (13 mL) que contenía 4-(3-yodo-1H-indol-1-il)-benzoato de ter-butilo (2.79 g, 6.65 mmoles), se añadieron $Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$ (0.344 g, 0.332 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (0.546 g, 1.33 mmoles; CAS: 657408-07-6) a temperatura ambiente. Entonces, se añadió el reactivo de organozinc preparado. Después de agitación a 60°C por 2 horas, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, y se añadió agua saturada de bicarbonato de sodio a 0°C. Después de que se filtró el sólido, el filtrado se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 97/3 a 20/80).

[0501] Una porción del producto obtenido (2.01 g, 3.26 mmoles) se disolvió en isopropanol (48.9 mL), y se añadió cloruro de calcio (5.79 g, 52.1 mmoles; CAS: 10043-52-4) enfriado en hielo. Entonces, se añadió gota a gota una solución acuosa (16.3 mL) que contenía hidróxido de litio (0.312 g, 13.0 mmoles; CAS: 1310-65-2). Después de la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, se ajustó a pH = 4 añadiendo una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 M, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano/metanol = 95/5 a 80/20). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

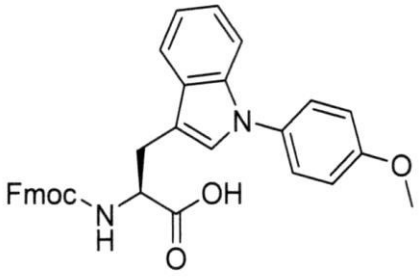
ESI-MS(+): m/z observada = 603.3 $(M+H)^+$.

[0502]

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Síntesis de Fmoc-W1Ph4OMe-OH

[0503] [Fórmula química 51]



[0504] Se obtuvo W1Ph4OMe mediante sustancialmente el mismo procedimiento de síntesis que para W1Ph4COO(tBu) en el ejemplo de referencia 1. Sin embargo, se usó 1-yodo-4-metoxibenceno como material de partida en lugar de 4-yodobenzoato de ter-butilo.

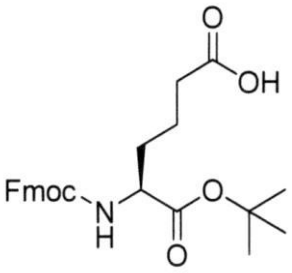
ESI-MS(+): m/z observada = 533.2 $(M+H)^+$.

[0505]

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

Síntesis de Fmoc-Hgl-OtBu

[0506] [Fórmula química 52]



[0507] En primer lugar, se disolvió ácido (S)-2-((((9H-fuoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico (2.00 g, 4.72 mmoles; CAS: 133464-45-6) en diclorometano (47.2 mL) y THF (4.72 mL), y se añadió 2,2,2-tricloroacetimidato de ter-butilo (2.06 g, 9.45 mmoles; CAS: 98946-18-0) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 12 horas, y entonces a 45°C por 20 horas. Después de que la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, el sólido se filtró, y se lavó con diclorometano (50 mL). El filtrado se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 80/20).

[0508] El 1-(*ter*-butil)(S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)hexanodioato de 6-alilo resultante (2.26 g, 4.72 mmoles) se disolvió en diclorometano (23.6 mL) y THF (23.6 mL). Entonces, se añadieron fenilsilano (1.16 mL, 9.44 mmoles; CAS: 694-53-1) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0.273 g, 0.236 mmoles; CAS: 14221-01-3) a 0°C.

[0509] La mezcla de reacción se agitó a 0°C por 1 hora, y entonces se agitó a temperatura ambiente por 24 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 100/0 a 80/20 a 30/70). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

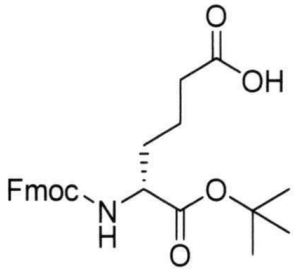
ESI-MS(+): m/z observada = 384.3 $(M+H-C4H8)^+$.

[0510]

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Síntesis de Fmoc-dhgl-OtBu

[0511] [Fórmula química 53]



[0512] Primero, se usó ácido D-α-aminoadípico (CAS: 7620-28-2) como material de partida, y se siguió el procedimiento descrito en Angew. Chem. Int. Ed., 2016, 55, 1192-1195 para obtener ácido (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico.

[0513] La síntesis de dhgl-O(tBu) se llevó a cabo prácticamente de la misma manera que la de Hgl-O(tBu). Sin embargo, en lugar del ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico, se usó el ácido (R)-2-(9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico obtenido anteriormente.

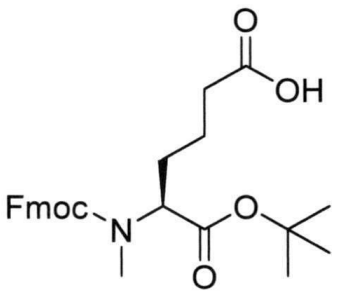
ESI-MS(+): m/z observada = 384.1 $(M+H-C4H8)^+$.

[0514]

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Síntesis de Fmoc-MeHgl-OtBu

[0515] [Fórmula química 54]



[0516] Se obtuvo MeHgl-O(tBu) mediante prácticamente el mismo procedimiento de síntesis que el de Hgl-O(tBu). Sin embargo, en lugar de ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico, se usó ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico como material de partida.

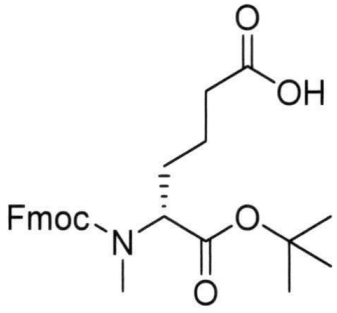
ESI-MS(+): m/z observada = 398.3 $(M+H-C4H8)^+$.

[0517]

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

Síntesis de Fmoc-Medhgl-OtBu

[0518] [Fórmula química 55]



.

[0519] Se usó el procedimiento descrito en el documento US18/109702 para obtener ácido (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico. Sin embargo, en lugar de ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico, se usó ácido (R)-2-(9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico como material de

partida.

[0520] Se obtuvo Medhgl-O(tBu) mediante un procedimiento de síntesis prácticamente idéntico al de Hgl-O(tBu). Sin embargo, en lugar del ácido (S)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico, se usó el ácido (R)-2-(9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)(metil)amino)-6-(aliloxi)-6-oxohexanoico obtenido anteriormente.

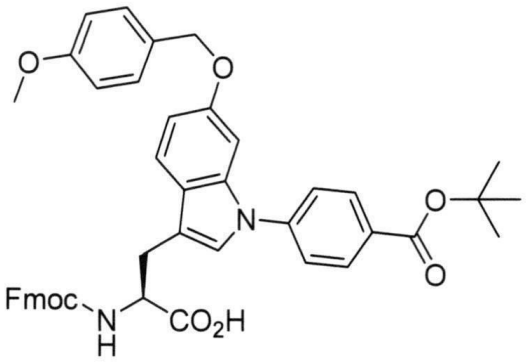
ESI-MS(+): m/z observada = 398.1 (M+H-C4H8).

[0521]

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

Síntesis de Fmoc-W6H(PMB)1Ph4COO(tBu)-OH

[0522] [Fórmula química 56]



[0523] A una solución de DMF (225 mL) que contenía 1H-indol-6-ol (15.0 g, 113 mmoles; CAS: 2380-86-1), se le añadieron carbonato de cesio (73.4 g, 225 mmoles; CAS: 534-17-8) y cloruro de 4-metoxibencilo (16.9 mL, 124 mmoles; CAS: 824-94-2). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 24 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y salmuera saturada, y el sólido se filtró. El filtrado se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó tres veces con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el sólido obtenido se suspendió en diclorometano y se filtró.

[0524] A una solución de DMF (13 mL) que contenía una porción del producto obtenido (3.7 g, 14.5 mmoles), se le añadieron éster ter-butílico de ácido 4-yodobenzoico (4.0 g, 13.2 mmoles; CAS: 120363-13-5), carbonato de cesio (6.5 g, 19.8 mmoles) y yoduro de cobre (0.50 g, 2.6 mmoles; CAS: 7681-65-4). La mezcla se agitó a 120°C por 7 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y salmuera saturada, y se filtró a través de Celite. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, se lavó dos veces con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 97/3 a 80/20).

[0525] Una porción del producto obtenido (5.6 g, 12.9 mmoles) se disolvió en DMF (431 mL), y se añadió N-yodosuccinimida (2.9 g, 12.8 mmoles; CAS: 516-12-1). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. La solución de reacción se enfrió en hielo, se extinguió con una solución acuosa de tiosulfato de sodio, y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con agua saturada de bicarbonato de sodio y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. El material resultante se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 90/10 a 50/50), para dar éster ter-butílico de ácido 4-(3-yodo-6-((4-metoxibencil)oxi)-1H-indol-1-il)benzoico.

[0526] A temperatura ambiente, se suspendió zinc (2.0 g, 31 mmoles; CAS: 7440-66-6) en DMF (26 mL), y se añadió yodo (2.6 g, 10.4 mmoles; CAS: 7790-99-0). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 20 minutos. A la solución de reacción se añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (5.6 g, 12.5 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 horas para preparar un reactivo de organozinc.

[0527] A una solución de DMF (26 mL) que contenía éster ter-butílico de ácido 4-(3-yodo-6-((4-metoxibencil)oxi)-1H-indol-1-il)benzoico (5.7 g, 10.4 mmoles), se añadieron $Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$ (0.54 g, 0.52 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (0.85 g, 2.1 mmoles; CAS: 657408-07-6) a temperatura ambiente. Entonces, se añadió el reactivo de organozinc preparado. La solución de reacción se agitó a 70°C por 3 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y salmuera saturada, y se filtró a través de Celite. El filtrado se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con agua saturada con bicarbonato de sodio y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 85/15 a 45/55).

[0528] Una porción del producto obtenido (5.0 g, 6.7 mmoles) se disolvió en tetrahidrofurano (34 mL) e isopropanol (16.7 mL), y se añadió una solución acuosa (11.7 mL) que contenía cloruro de calcio (11.9 g, 107 mmoles; CAS: 10043-52-4) en frío. Entonces, se añadió gota a gota una solución acuosa (5.0 mL) que contenía hidróxido de litio (0.64 g, 26.8 mmoles; CAS: 1310-65-2). Una vez que concluyó la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 días. El pH se ajustó a 3 añadiendo ácido clorhídrico 1 M. La solución de reacción se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica resultante se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 65/35 a 0/100, y posteriormente diclorometano/metanol = 100/0 a 90/10). Las fracciones que contenían al producto objetivo se

concentraron y entonces se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo/metanol = 100/0 a 90/10). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

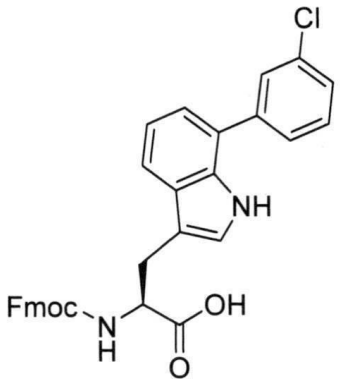
ESI-MS(+): m/z observada = 739.3 $(M+H)^+$.

[0529]

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

Síntesis de Fmoc-W7Ph3C-OH

[0530] [Fórmula química 57]



[0531] En primer lugar, se disolvieron 7-bromo-1H-indol (19.6 g, 100 mmoles; CAS: 51417-51-7), ácido (3-clorofenil)borónico (18.8 g, 120 mmoles; CAS: 63503-60-6), $Pd(PPh_3)_4$ (5.8 g, 5.0 mmoles; CAS: 14221-01-3) y fosfato tripotásico (63.7 g, 300 mmoles; CAS: 7778-53-2) en 1,4-dioxano (450 mL) y agua (50 mL). La mezcla se agitó a 100°C por 75 minutos. La solución de reacción se diluyó con agua y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 90/10 a 70/30).

A una solución de DMF (80 mL) que contenía una porción del producto obtenido (6.8 g, 30 mmoles), se añadieron hidróxido de potasio (4.2 g, 75 mmoles), y entonces una solución de DMF (20 mL) que contenía yodo (7.6 g, 30 mmoles; CAS: 7553-56-2) enfriada en hielo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 90/10 a 80/20), para obtener 7-(3-clorofenil)-3-yodo-1H-indol.

[0532] A temperatura ambiente, se suspendió zinc (3.9 g, 60 mmoles) en DMF (50 mL), y se añadió yodo (1.5 g, 6.0 mmoles). La mezcla se agitó entonces a 60°C por 30 minutos. A la solución de reacción se le añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo

(10.8 g, 24.0 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 90 minutos para preparar un reactivo de organozinc.

[0533] Después, se añadieron 7-(3-clorofenil)-3-yodo-1H-indol (7.1 g, 20 mmoles), $Pd_2(dba)_3$ $CHCl_3$ (1.0 g, 1.0 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (1.6 g, 4.0 mmoles; CAS: 657408-07-6) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 60°C por 30 minutos. Entonces, se añadió el reactivo de organozinc preparado, y la mezcla se agitó a 60°C por 1 hora. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo, y se extinguió añadiendo ácido clorhídrico 0.5 M en frío. Después de agitación por 5 minutos en frío, la mezcla se filtró a través de Celite y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, y la fase orgánica resultante se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el material resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 90/10 a 40/60).

[0534] Una porción del producto resultante (4.4 g, 8.0 mmoles) se disolvió en isopropanol (120 mL), se añadió cloruro de calcio (14.2 g, 128 mmoles; CAS: 10043-52-4) a 0°C, y se añadió gota a gota una solución acuosa (40 mL) que contenía hidróxido de litio (0.77 g, 31.9 mmoles; CAS: 1310-65-2). Una vez que concluyó la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y se ajustó a pH de 3 a 4 añadiendo ácido clorhídrico 1 M (30 mL). La solución de reacción se extrajo tres veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con agua y entonces con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 30/70 a 80/20). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

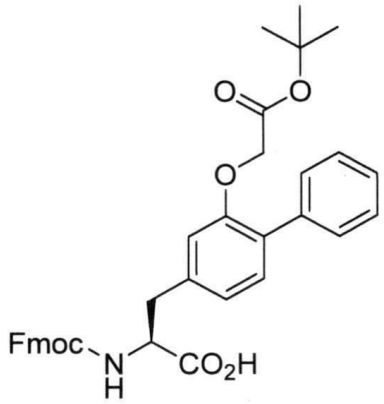
ESI-MS(+): m/z observada = 537.2 $(M+H)^+$.

[0535]

EJEMPLO DE REFERENCIA 9

Síntesis de Fmoc-pBph2aao(tBu)-OH

[0536] [Fórmula química 58]



[0537] En primer lugar, se disolvió 4-bromo-[1,1'-bifenil]-2-ol (4.5 g, 18.0 mmoles; CAS: 1679324-76-5) en acetona (90 mL), y se añadieron carbonato de cesio (8.8 g, 27.0 mmoles; CAS: 534-17-8) y 2-bromoacetato de ter-butilo (4.0 mL, 27.0 mmoles; CAS: 5292-43-3). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 19 horas. Se concentró bajo presión reducida, y se extinguió con agua saturada de bicarbonato de sodio. Se extrajo con acetato de etilo, y se lavó con salmuera saturada. El material resultante se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 97/3 a 90/10), para dar 2-((4-bromo-[1,1'-bifenil]-2-il)oxi)acetato de ter-butilo.

[0538] A temperatura ambiente, se suspendió zinc (3.6 g, 55 mmoles) en DMF (45 mL), y se añadió yodo (4.6 g, 18.2 mmoles). La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente por 30 minutos. A la solución de reacción se le añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (5.6 g, 12.5 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3.5 horas para preparar un reactivo de organozinc. A una solución de DMF (45 mL) que contenía 2-((4-bromo-[1,1'-bifenil]-2-il)oxi)acetato de ter-butilo (6.6 g, 18.2 mmoles), se añadieron $Pd_2(dba)_3.CHCl_3$ (0.94 g, 0.91 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (1.5 g, 3.6 mmoles; CAS: 657408-07-6) a temperatura ambiente. Entonces, se añadió el reactivo de organozinc preparado. La solución de reacción se agitó a 70°C por 3 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y salmuera saturada, y se filtró a través de Celite. El filtrado se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con agua saturada con bicarbonato de sodio y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato

de etilo = 90/10 a 40/60).

[0539] Una porción del producto obtenido (2.9 g, 4.7 mmoles) se disolvió en tetrahidrofurano (24 mL) e isopropanol (11.9 mL), y se añadió una solución acuosa (8.3 mL) que contenía cloruro de calcio (6.3 g, 56.9 mmoles; CAS: 10043-52-4) bajo condiciones heladas. Entonces, se añadió gota a gota una solución acuosa (3.6 mL) que contenía hidróxido de litio (0.34 g, 14.2 mmoles; CAS: 1310-65-2). Una vez completada la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 16 horas. El pH se ajustó a 3 añadiendo ácido clorhídrico 1 M. La solución de reacción se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica resultante se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 80/20 a 60/40, entonces diclorometano/metanol = 95/5 a 80/20). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

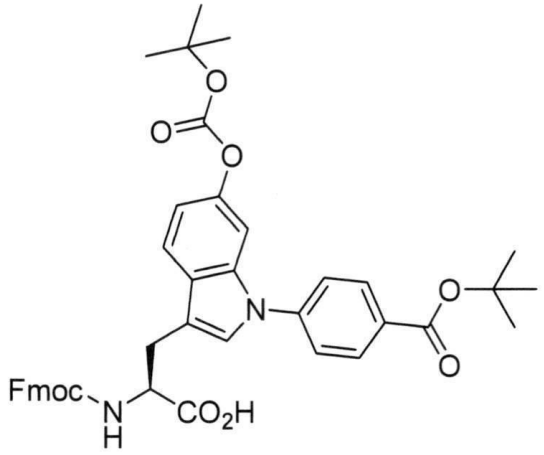
ESI-MS(+): m/z observada = 538.3 $(M+H)^+$.

[0540]

EJEMPLO DE REFERENCIA 10

Síntesis de Fmoc-W6H(Boc)1Ph4COO(tBu)-OH

[0541] [Fórmula química 59]



.

[0542] A una solución de DMSO (700 mL) que contenía 1H-indol-6-ol (35.0 g, 263 mmoles; CAS: 2380-86-1), se añadieron 4-yodobenzoato de ter-butilo (88 g, 289 mmoles; CAS: 120363-13-5), bromuro de cobre(I) (1.9 g, 13.1 mmoles; CAS: 7787-70-4), carbonato de potasio (109 g, 789 mmoles; CAS: 534-17-8), hidrato de ácido α-D-galacturónico (5.6 g, 26.3 mmoles; CAS: 91510-62-2) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó entonces a 100°C durante la noche. La mezcla se filtró, y el sólido se lavó con acetato de etilo. El filtrado se combinó y se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y salmuera saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida.

[0543] El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 80/20). Una porción del producto resultante (13.7 g, 44.3 mmoles) se disolvió en acetonitrilo (140 mL), y se añadieron DMAP (0.54 g, 4.43 mmoles) y Boc_2O (9.7 g, 44.3 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. La reacción se extinguió con agua, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida.

[0544] El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 83/17). Una porción de la mezcla resultante (16.2 g, 39.6 mmoles) se disolvió en DMF (160 mL), y se añadió N-yodosuccinimida (9.8 g, 43.5 mmoles; CAS: 516-12-1) en frío. Entonces, la mezcla se agitó por 2 horas y se extinguió con agua saturada de bicarbonato de sodio bajo condiciones heladas, y entonces se diluyó con agua. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y entonces se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 95/5), para dar 4-(6-((ter-butoxicarbonil)oxi)-3-yodoindol-1-il-benzoato de ter-butilo.

[0545] A temperatura ambiente, se suspendió zinc (7.0 g, 106 mmoles; CAS: 7440-66-6) en DMF (400 mL), y se añadió yodo (2.7 g, 10.6 mmoles; CAS: 7790-99-0). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 20 minutos. A la solución de reacción se le añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (19 g, 42.6 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 hora.

[0546] A la mezcla resultante se le añadieron 4-(6-((ter-butoxicarbonil)oxi)-3-yodoindol-1-il-benzoato de ter-butilo (19 g, 36 mmoles), $Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$ (1.82 g, 1.8 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (2.91 g, 7.1 mmoles; CAS: 657408-07-6) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó entonces a 50°C por 3 horas. La solución de reacción se llevó a temperatura ambiente, y la reacción se extinguió con agua. La mezcla se filtró, y el sólido se lavó con acetato de etilo.

[0547] El filtrado resultante se combinó y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 67/33).

[0548] Una mezcla que contenía una porción del producto obtenido y otro lote (40 g, 55 mmoles) se disolvió en isopropanol (900 mL), y se añadió una solución acuosa (240 mL) que contenía cloruro de calcio (96.9 g, 873 mmoles; CAS: 10043-52-4) bajo condiciones de refrigeración. Entonces, se añadió gota a gota una solución acuosa (60 mL) que contenía hidróxido de litio (5.24 g, 218 mmoles; CAS: 1310-65-2). Una vez que concluyó la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente durante la noche. Se añadió una solución acuosa de fosfato diácido de sodio, y el pH se ajustó a 4. La solución de reacción se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica combinada se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtración y concentración bajo presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice de fase invertida (C18; gradiente: H_2O que contenía bicarbonato de amonio 10 nM/acetonitrilo = 95/5 a 0/100 durante 40 minutos). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

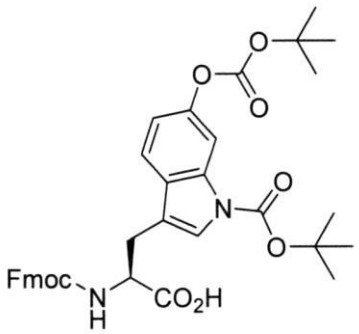
ESI-MS(+): m/z observada = 741.4 $(M+Na)^+$.

[0549]

EJEMPLO DE REFERENCIA 11

Síntesis de Fmoc-W6H(Boc,Boc)-OH

[0550] [Fórmula química 60]



.

[0551] A una solución de DMF (65 mL) que contenía (1H-indol-6-il)carbonato de ter-butilo (4.6 g, 19.5 mmoles; CAS: 873779-75-0) se añadió N-yodosuccinimida (4.4 g, 19.5 mmoles; CAS: 516-12-1). La mezcla se agitó a 25°C por 2 horas. La mezcla se enfrió en hielo, se extinguió con una solución acuosa de tiosulfato de sodio, y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso y salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (20% de heptano que contiene diclorometano/20% de acetato de etilo que contiene diclorometano = 100/0 a 70/30).

[0552] A una solución de DMF (48 mL) que contenía una porción del producto obtenido (5.2 g, 14.5 mmoles) se le añadieron bicarbonato de di-*ter*-butilo (3.8 g, 17.3 mmoles; CAS: 24424-99-5) y 4-dimetilaminopiridina (0.18 g, 1.45 mmoles; CAS: 1122-58-3). La mezcla se agitó entonces a 25°C por 3 horas. La mezcla se diluyó con salmuera saturada, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (heptano/acetato de etilo = 95/5 a 80/20), para dar 6-((ter-butoxicarbonil)oxi)-3-yodo-1H-indol-1-carboxilato de ter-butilo.

[0553] Se suspendió zinc (2.9 g, 43.8 mmoles; CAS: 7440-66-6) en DMF (37mL), y se añadió yodo (3.7 g, 14.6 mmoles; CAS: 7553-56-2). La mezcla se agitó entonces a 25°C por 30 minutos. A la suspensión se añadió (R)-2-((((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (7.9 g, 17.5 mmoles; CAS: 156017-42-4). La mezcla se agitó a 25°C por 2 horas para preparar un reactivo de organozinc.

[0554] A una solución de DMF que contenía 6-((ter-butoxicarbonil)oxi)-3-yodo-1H-indol-1-carboxilato de *ter*-butilo (6.7 g, 14.6 mmoles), se añadieron $Pd_2(dba)_3 \cdot CHCl_3$ (0.76 g, 0.73 mmoles; CAS: 52522-40-4) y SPhos (1.2 g, 2.9 mmoles; CAS: 657408-07-6) a 25°C. Se añadió el reactivo de organozinc preparado, y entonces la mezcla se agitó a 70°C por 2 horas. La mezcla se llevó a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y salmuera saturada, y se filtró a través de Celite. El filtrado se extrajo con acetato de etilo, y se lavó secuencialmente con bicarbonato de sodio acuoso y salmuera saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (heptano/acetato de etilo = 90/10 a 60/40).

[0555] A una solución de THF/2-propanol (95 mL; 2/1) que contenía una porción del producto obtenido (8.3 g, 12.7 mmoles), se añadió una solución acuosa (22 mL) que contenía cloruro de calcio (16.9 g, 152 mmoles; CAS: 10043-52-4) en frío. Se añadió una solución acuosa (9.5 mL) que contenía hidróxido de litio (0.91 g, 38.1 mmoles; CAS: 1310-65-2), y la mezcla se agitó entonces a 25°C durante la noche. Después, se añadió ácido clorhídrico 1 N (38 mL) a la solución de reacción, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo y se lavó con salmuera saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (diclorometano/metanol = 95/5 a 90/10). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

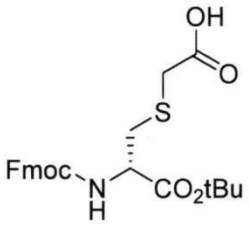
ESI-MS(+): m/z observada = 531.2 $(M-C8H16+H)^+$.

[0556]

EJEMPLO DE REFERENCIA 12

Síntesis de Fmoc-dcaa-OtBu

[0557] [Fórmula química 61]



[0558] A una solución de THF que contenía (((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)-D-cisteína (14.0 g, 40.8 mmoles; CAS: 157355-80-1) se añadieron una solución acuosa (102 mL) que contenía bicarbonato de sodio (6.9 g, 82.0 mmoles) y 2-cloroacetato de alilo (5.2 mL, 44.9 mmoles; CAS: 2916-14-5) bajo condiciones de refrigeración. Entonces, la mezcla se agitó a 25°C por 4 horas. El pH se ajustó a 4 añadiendo ácido clorhídrico 1 M, y la mezcla se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera saturada, se filtró, y se concentró bajo presión reducida.

[0559] El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 90/10 a 20/80). A una solución de diclorometano (102 mL) que contenía una porción del producto obtenido (9.0 g, 20.4 mmoles) se añadió O-*ter*-butil-N,N'-diisopropilisourea (20.4 g, 102 mmoles; CAS: 71432-55-8) bajo condiciones de enfriamiento con hielo. La mezcla se agitó a 40°C por 6 horas. El sólido resultante se filtró, y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se lavó dos veces con agua saturada de bicarbonato de sodio, se secó sobre sulfato de magnesio, y se concentró.

[0560] El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo = 80/20 a 30/70). A una solución de diclorometano (44 mL) que contenía una porción del producto obtenido (4.4 g, 8.8 mmoles), se le añadieron fenilsilano (2.2 mL, 17.7 mmoles) y $Pd(PPh_3)_4$ (2.0 g, 1.8 mmoles) bajo condiciones de enfriamiento con hielo. La mezcla se agitó entonces a 25°C por 4 horas. La solución de reacción se concentró bajo presión reducida, y entonces se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano/acetato de etilo = 90/10 a 40/60). De esta manera, se obtuvo la sustancia del título.

ESI-MS(+): m/z observada = 402.0 $(M-C4H8+H)^+$.